

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

NOUVEAUX DOCUMENTS DE LA COMMISSION UKRAINIENNE POUR L'ÉTUDE DE LA VACCINATION DES NOUVEAU-NÉS PAR LE BCG. VACCINATION D'UN SUR DEUX JUMEAUX

par B. JAKHNIS et S. CHAGALOVA.

*(Institut de Kharkoff pour les Tuberculeux.
Directeur : Professeur Feinschmidt.)*

La vaccination BCG selon la méthode de Calmette est expérimentée en Ukraine, principalement à Kharkoff, depuis plus de cinq ans. En abordant ce travail, en août 1925, nous nous étions proposé d'élucider la question de savoir si la vaccination est efficace chez les enfants obligés de vivre dans un milieu plus ou moins manifestement tuberculeux. Nous estimions que l'innocuité du BCG n'était plus discutable après la publication de tant de travaux et de tant d'expériences qui l'avaient démontrée et que la Commission ukrainienne avait elle-même confirmée. Pourtant, dans notre propre pays (Korschoun, à Moscou) et ailleurs (Petroff, aux Etats-Unis; Pirquet, à Vienne), quelques voix contradictoires s'étaient élevées, prétendant que l'avirulence du BCG n'était pas prouvée. Mais le nombre des défenseurs de la méthode de Calmette s'accroissait

sans cesse ; les adversaires et les sceptiques se faisaient de plus en plus rares.

Au début de 1930, une Conférence des Commissions centrales et locales de l'Union des Républiques Soviétiques pour l'étude du BCG fut réunie à Moscou. Après une série de rapports et de discussions, elle adopta la résolution suivante :

« Estimant que l'innocuité du BCG est suffisamment démontrée, la Conférence est d'avis que les expériences à venir doivent porter sur les qualités immunisantes du vaccin et sur les différents modes d'emploi de celui-ci. »

Tout à coup, la tragédie de Lübeck vint à notre connaissance. Il n'est plus douteux pour personne aujourd'hui qu'elle fut le résultat d'une fatale erreur de laboratoire. Mais elle jeta pendant quelque temps le trouble et l'émotion dans les cercles médicaux, et quelques-uns se reprirent à discuter la possibilité d'une mutation dans l'organisme des enfants vaccinés. C'est pourquoi il n'est pas inopportun de rapporter ici les observations que nous avons pu faire. Elles constituent de vraies expériences de laboratoire et projettent une vive lumière sur le sujet qui nous intéresse.

*
* *

Jusqu'à présent, pour démontrer l'innocuité de la vaccination BCG, nous avons étudié un groupe assez nombreux d'enfants élevés en dehors de tout contact tuberculeux, en suivant leur développement physiologique, leurs courbes de poids, leurs réactions contre les diverses influences nuisibles endo ou exogènes, leur mortalité générale par les diverses maladies intercurrentes. En comparant toutes ces données avec celles fournies par les enfants qui fréquentaient nos consultations de nourrissons, nous arrivions à cette conclusion que la vaccination BCG est manifestement inoffensive.

On a objecté que les enfants vaccinés étaient mieux suivis, et les parents mieux instruits des mesures sanitaires et hygiéniques ; que leurs conditions d'existence n'étaient pas toujours les mêmes. Or nous avons pris soin de choisir des groupes aussi exactement comparables que possible, ayant le même genre de vie, presque toujours dans des logements très défectueux.

Mais, pour écarter toute supposition qu'il existe une différence entre les vaccinés et les non vaccinés, nous avons pensé à concentrer notre observation sur les *enfants jumeaux* qu'il nous était possible de suivre régulièrement dans leurs familles, en nous assurant de la parfaite identité de leurs conditions d'existence, des soins qui leur sont dispensés, de leur allaitement, ou de leur alimentation, de la surveillance constante du médecin et de la visiteuse.

On sait que les jumeaux ne sont jamais égaux lors de leur naissance. L'un est moins vigoureux, d'un poids moindre que l'autre. Nous avons constamment choisi celui-là pour le vacciner, laissant le plus apparemment robuste comme témoin.

Maintenant, après environ quatre années, nous pouvons faire connaître les résultats de cette expérience qui ne manque pas d'intérêt.

Disons d'abord que 20 paires de jumeaux non vaccinés, suivis par trois consultations de nourrissons de la ville de Kharkoff, nous ont servi de témoins. Nous avons étudié avec soin leur développement. Les uns avaient à peu près le même poids à leur naissance (3.000 et 3.400 grammes); d'autres étaient très petits (1.000 et 1.500 grammes); d'autres offraient des différences de poids considérables, jusqu'à 500 grammes. Mais tous étaient élevés dans des conditions exactement semblables. Deux sont morts presque simultanément de gastro-entérite. Parmi les plus faibles à leur naissance, un petit nombre a succombé. Les autres se sont normalement développés, mais sont toujours restés moins lourds et moins vigoureux. Il n'y a eu aucune exception à cette règle.

Voyons maintenant ce que nous avons constaté chez 16 paires de jumeaux dont, à chaque naissance, *le plus faible seul était vacciné* avec le BCG, parce que nous nous faisons le raisonnement suivant : Si le vaccin peut être nuisible à l'enfant, cet effet nocif doit se manifester plus sûrement chez l'enfant le plus chétif que chez son compagnon plus résistant, et s'il se trouve que la croissance des deux jumeaux ne diffère pas de ce que l'on observe sur les témoins dont nous avons parlé ci-dessus, on peut considérer comme très probable l'innocuité pratique de la vaccination.

Or, voici résumés nos documents. Dans un premier groupe de

5 paires de jumeaux, la différence fut à peu près nulle. Deux paires de jumeaux ont succombé en même temps à une infection grave de gastro-entérite due à une alimentation très défectueuse.

Un second groupe de 4 paires de jumeaux ne nous a fourni que des indications peu précises. Pour les deux premières paires, le poids des vaccinés est resté un peu plus faible, mais ils se sont montrés cependant plus vigoureux que les non vaccinés.

Pour les 2 autres paires, vers deux ans et demi, les vaccinés avaient un poids supérieur à celui des non vaccinés (respectivement 11.700 grammes et 11.500 ; 12.400 et 11.600). Mais, fait intéressant, pendant leur première année les vaccinés ont supporté une grave maladie d'intestin (gastro-entérite et entérocolite) qui a déterminé chez eux une chute de poids, puis une reprise, et ensuite un accroissement supérieur à celui des non vaccinés. Ils se sont montrés plus résistants.

Notre troisième groupe est beaucoup plus nettement démonstratif. Il comprend 7 paires de jumeaux, dont nous donnons ci-après les courbes de poids et l'appréciation de l'état général.

PAIRES	A LA NAISSANCE (grammes)	A 15 MOIS	A 30 MOIS	A 42 MOIS	ÉTAT général (1)
I } Vacciné . . .	2.300	9.300			+
I } Non vacciné .	2.700	7.700			—
II } Vacciné . . .	2.600		12.700		++
II } Non vacciné .	2.900		11.700		+
III } Vacciné . . .	2.600		13.200		++
III } Non vacciné .	2.800		11.000		+
IV } Vacciné . . .	2.850			16.300	++
IV } Non vacciné .	3.000			15.700	+
V } Vacciné . . .	2.800			13.700	++
V } Non vacciné .	3.300			13.200	+
VI } Vacciné . . .	2.300		14.800		++
VI } Non vacciné .	2.400		14.600		+
VII } Vacciné . . .	3.200			14.200	++
VII } Non vacciné .	3.400			14.300	+

(1) +, croissance normale; ++, croissance supérieure; —, croissance déficiente.

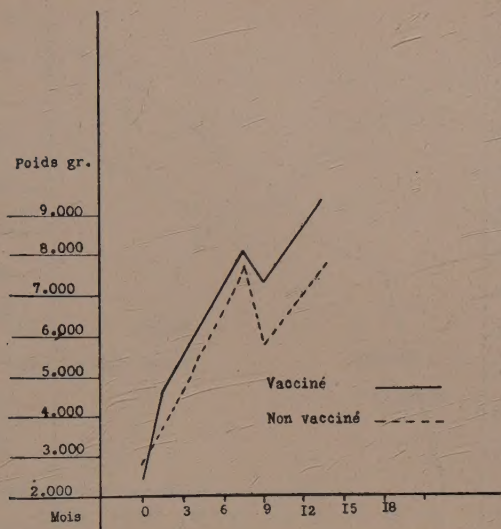


FIG. 1. — Jumeaux, paire n° 1.

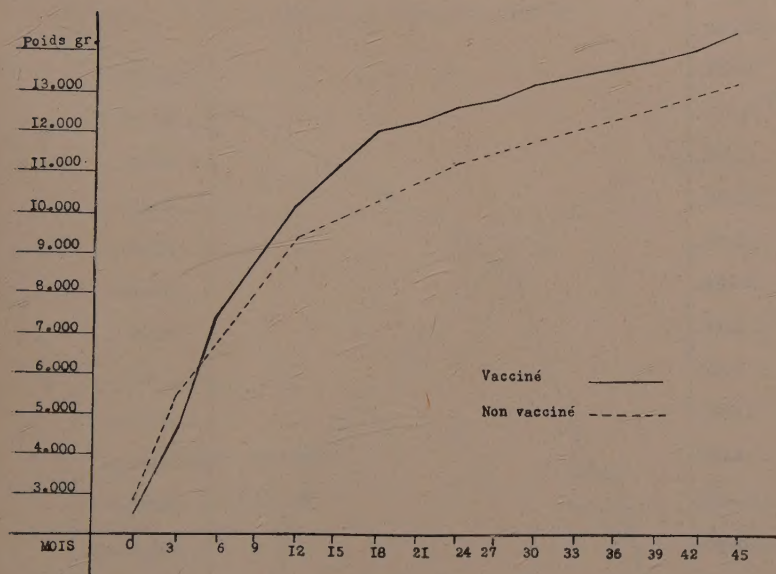


FIG. 2. — Jumeaux, paire n° 2.

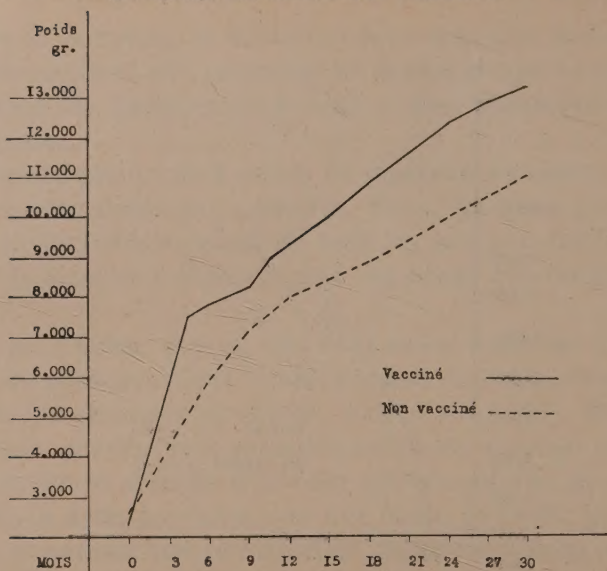


FIG. 3. — Jumeaux, paire n° 3.

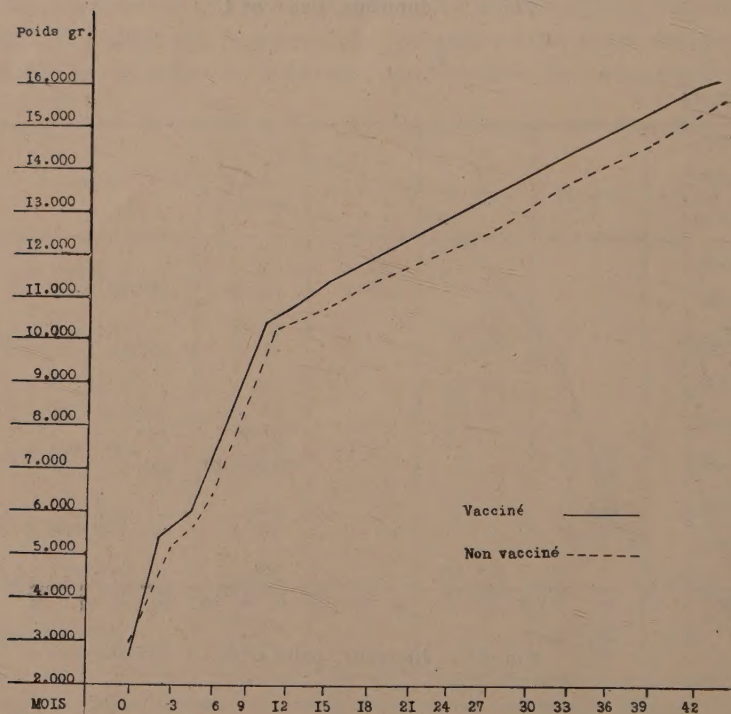


FIG. 4. — Jumeaux, paire n° 4.

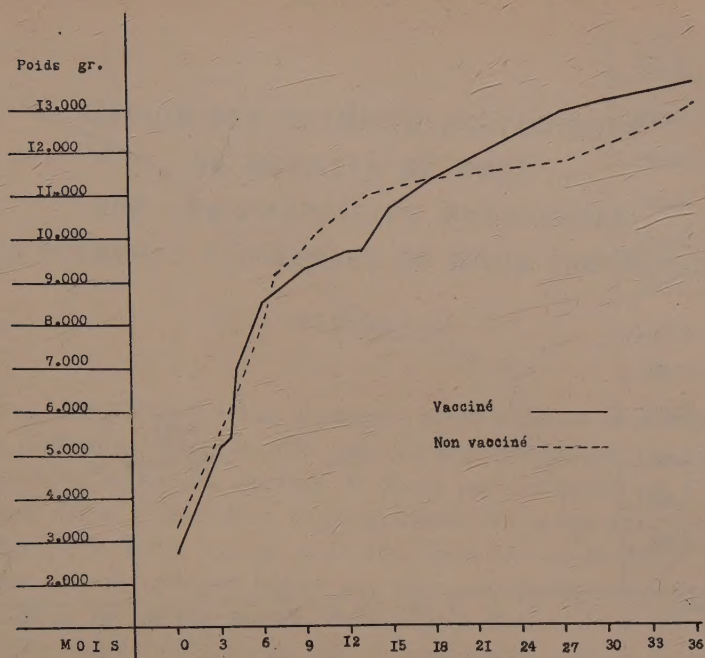


FIG. 5. — Jumeaux, paire n° 5.

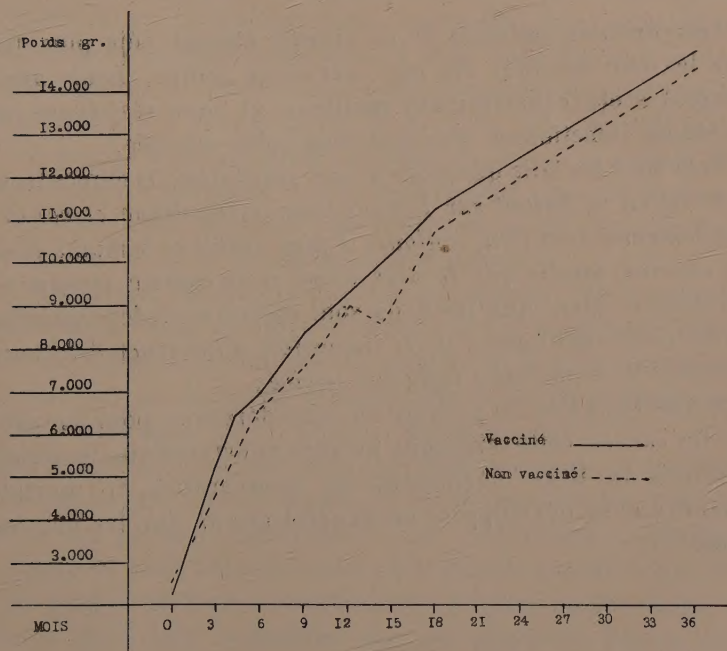


FIG. 6. — Jumeaux, paire n° 6.

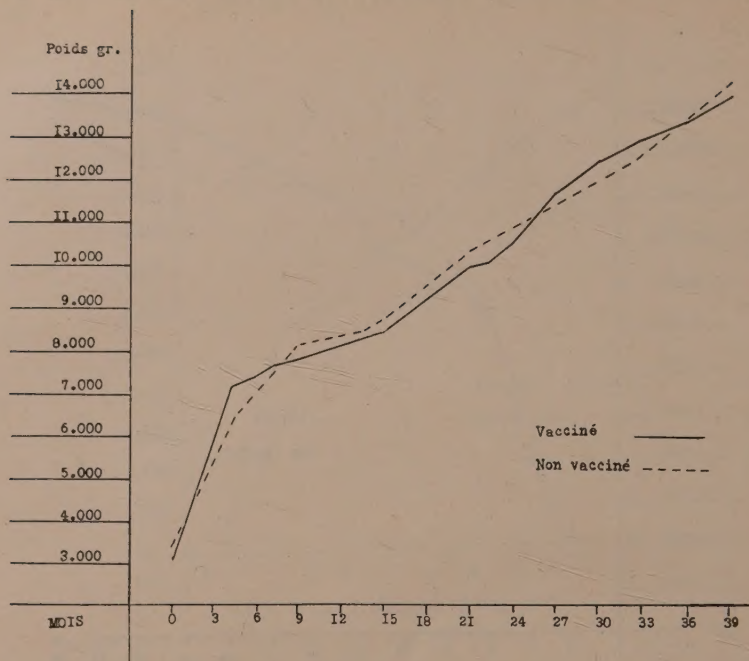


FIG. 7. — Jumeaux, paire n° 7.

Les jumeaux vaccinés de ce groupe étaient déjà plus forts que les non vaccinés dès leur première année. Leur aspect général a été constamment meilleur et leur résistance aux maladies infectieuses manifestement plus accusée.

Tels sont les faits que nous avons constatés. Ils démontrent :

1° Qu'en se basant sur l'observation méthodique et continue des jumeaux dont l'un, toujours le plus faible et le moins lourd, est vacciné, tandis que le plus lourd reste comme témoin non vacciné, et alors que les deux sont élevés dans des conditions strictement identiques, il est impossible d'attribuer à la vaccination BCG la moindre influence nocive ;

2° Qu'il y a lieu de prendre en considération, pour en préciser les causes, cette remarque presque constante que les enfants vaccinés au BCG fournissent un pourcentage de mortalité moindre et se développent en général mieux que les non vaccinés.

**ACTION DES EXTRAITS ACÉTONIQUES
DE BACILLES DE KOCH
SUR LES PROPRIÉTÉS PATHOGÈNES
DES ÉLÉMENTS FILTRABLES DU VIRUS TUBERCULEUX,**

par L. NÈGRE et J. VALTIS.

Les recherches que l'un de nous a poursuivies avec A. Boquet ont mis en évidence le rôle activant des substances ciro-graisseuses, extraites des bacilles de Koch par l'acétone, sur l'évolution de la tuberculose expérimentale des petits animaux de laboratoire. Cette action peut être prouvée de la façon suivante : on infecte des lapins par inoculation intraveineuse de 1/1.000 de milligramme de bacilles tuberculeux (souche Bovine-Vallée) et des cobayes par inoculation sous-cutanée de 1/10.000 de milligramme des mêmes bacilles. Huit jours après cette inoculation, ces animaux sont traités deux fois par semaine par des injections sous-cutanées de 1 cent. cube d'extrait acétonique de bacilles tuberculeux en suspension aqueuse (1 cent. cube correspondant à 1 centigramme de bacilles pesés à l'état sec).

Si on poursuit ces injections pendant quelques semaines, on constate que les animaux traités maigrissent plus rapidement que les témoins et meurent plus précocement qu'eux avec des lésions beaucoup plus disséminées et étendues.

Ces faits ayant été établis dans des expériences plusieurs fois répétées, nous nous sommes demandé si les propriétés activantes des extraits acétoniques de bacilles de Koch ne s'exerceraient pas sur les éléments filtrables du virus tuberculeux qui n'ont habituellement aucun pouvoir tuberculigène.

Nous savons en effet que lorsqu'on inocule à des cobayes des filtrats sur bougie Chamberland L2 de cultures de bacilles de Koch ou de produits tuberculeux, les altérations anatomo-pathologiques observées se limitent à la simple hypertrophie de certains ganglions. Ceux-ci contiennent de rares bacilles acido-résistants qu'il faut rechercher souvent plusieurs heures au

microscope avant de les trouver. D'autre part, les bacilles issus de ces éléments filtrables ne récupèrent leur virulence qu'au bout de plusieurs passages chez le cobaye.

Il y aurait donc grand intérêt à trouver une méthode permettant d'exalter d'emblée la virulence des éléments filtrables du virus tuberculeux et de les mettre ainsi en évidence plus facilement.

Nous avons, dans ce but, essayé de traiter des cobayes inoculés avec des filtrats de cultures de bacilles de Koch par des injections sous-cutanées d'extrait acétonique de bacilles tuberculeux.

EXPÉRIENCE 1. — 9 cobayes sont inoculés le 25 janvier 1929 par voie sous-cutanée dans l'aîne droite avec 10 cent. cubes de filtrat sur bougie Chamberland L2 de cultures de la souche Bovine-Vallée sur milieu synthétique de Sauton, âgée de six jours.

6 de ces animaux ont été traités deux fois par semaine à partir du 5 février par des injections sous-cutanées dans l'aîne droite de 2 cent. cubes d'extrait acétonique de bacilles tuberculeux (1 centigramme de bacilles desséchés par centimètre cube d'acétone).

3 cobayes ont été conservés comme témoins.

Le 26 février, 1 cobaye (A) qui a reçu 6 injections d'extrait acétonique est sacrifié.

Il présente à droite deux gros ganglions inguinaux dont l'un est caséeux et un ganglion sous-lombaire du même côté. Ces ganglions contiennent des bacilles de Koch. Ils sont broyés et inoculés sous la peau de 3 cobayes (Lot A).

Le 12 avril, un second cobaye (B) qui a reçu 12 injections d'extrait acétonique est sacrifié, trois semaines après la dernière injection.

Il présente un gros ganglion inguinal au point d'inoculation, un ganglion sous-lombaire du même côté, de gros ganglions trachéo-bronchiques, contenant des bacilles de Koch et deux tubercules de la rate.

Les ganglions et les lésions de la rate sont broyés et inoculés sous la peau de 4 cobayes (Lot B).

Le 5 juillet, les 4 cobayes traités survivants et les 3 témoins ont été éprouvés par une injection intradermique de tuberculine. Les animaux traités ont présenté des réactions positives fortes, dont deux nécrotiques, les animaux témoins n'ont pas réagi.

Sacrifiés après cette épreuve, aucun de ces animaux ne présentait de lésion tuberculeuse.

Lot A. — 3 cobayes sont inoculés le 26 février sous la peau de l'aîne droite avec les ganglions du cobaye de l'expérience précédente sacrifié après avoir reçu 6 injections d'extrait acétonique de bacilles tuberculeux.

Le 12 mars, 1 cobaye meurt. Il présente à droite un ganglion inguinal et un ganglion sous-lombaire hypertrophiés, et un gros paquet de ganglions trachéo-bronchiques contenant des bacilles de Koch.

Ces ganglions sont broyés et inoculés sous la peau de 3 cobayes. Ces derniers cobayes sacrifiés : l'un, le 17 septembre, les deux autres le 19 novembre n'ont présenté aucun hypertrophie ganglionnaire, ni de lésion tuberculeuse.

Lot B. — 3 cobayes sont inoculés le 12 avril sous la peau de l'aine droite avec les ganglions et les lésions de la rate du cobaye B de l'expérience précédente, sacrifié après avoir reçu 12 injections d'extrait acétonique de bacilles tuberculeux, trois semaines après la dernière injection.

Le 30 décembre suivant, 1 cobaye est mort avec des lésions tuberculeuses généralisées aux organes.

Les 2 autres cobayes sont sacrifiés le même jour. Un avait une tuberculose de la rate, l'autre ne présentait aucune lésion.

En résumé, dans cette première expérience, sur 6 cobayes inoculés avec le filtrat de culture de bacilles de Koch et traités par des injections d'extrait acétonique de ces bacilles, un (A), ayant reçu 6 injections de cet extrait et sacrifié immédiatement après, a présenté des lésions ganglionnaires caséuses contenant des bacilles de Koch; un autre (B), ayant reçu 12 injections et sacrifié trois semaines après la dernière injection, a présenté des lésions ganglionnaires et spléniques, contenant des bacilles de Koch. Les 4 autres cobayes traités, quoique ayant réagi fortement à la tuberculine, n'ont pas présenté de lésions, de même que les 3 cobayes témoins.

Les cobayes inoculés avec les ganglions du cobaye A ont présenté des ganglions hypertrophiés contenant des bacilles de Koch. Réinoculés à d'autres cobayes, ces ganglions ne leur ont donné aucune lésion.

Les cobayes inoculés avec les ganglions du cobaye B ont présenté, l'un des lésions généralisées aux organes, un autre des lésions spléniques, le dernier est resté indemne.

Cette expérience méritait d'être reprise.

EXPÉRIENCE 2. — 13 cobayes sont inoculés le 21 février 1930 par voie sous-cutanée dans l'aine droite avec 11 cent. cubes de filtrat sur bougie Chamberland L2 d'une culture de la souche Bovine-Vallée, âgée de sept jours, sur milieu synthétique de Sauton.

9 ont été traités deux fois par semaine à partir du 25 février par des injections sous-cutanées dans l'aine droite de 2 cent. cubes d'extrait acétonique de bacilles tuberculeux.

3 ont été conservés comme témoins.

Le 21 mars, après 7 injections d'extrait acétonique, 5 cobayes traités avaient des ganglions hypertrophiés dans l'aine droite.

L'un d'eux (C) est sacrifié. Il présente dans l'aine droite trois petits ganglions de la grosseur d'un grain de blé. Les ganglions sous-lombaires sont légèrement hypertrophiés; on trouve des bacilles de Koch dans les deux groupes de ganglions qui sont broyés et inoculés à 3 cobayes (Lot C).

Le 1^{er} mai, après la quatorzième injection d'extrait acétonique, 2 cobayes, qui avaient des ganglions dans l'aine droite, sont sacrifiés.

L'un (D) a un ganglion inguinal droit, de la grosseur d'un noyau de cerise, caséeux, contenant de nombreux bacilles de Koch. Le ganglion sous-lombaire du même côté est légèrement hypertrophié. Ces ganglions sont broyés et inoculés à 6 cobayes (Lot D).

L'autre (E) a un ganglion inguinal droit ayant les dimensions d'un petit pois, et un ganglion sous-lombaire du même côté plus petit, contenant des bacilles de Koch.

Ces ganglions sont broyés et inoculés sous la peau de 6 cobayes (Lot E).

Le 8 août, trois mois après la quatorzième et dernière injection d'extrait acétonique, un autre cobaye traité qui a une masse ganglionnaire dans l'aîne droite est sacrifié (F).

Ses ganglions inguinaux caséux, ses ganglions sous lombaires et ses ganglions trachéo-bronchiques très fortement hypertrophiés et scléreux contiennent des bacilles de Koch.

La rate présente de nombreux tubercules.

Toutes ces lésions sont broyées et inoculées à 2 cobayes (Lot F).

Le 26 août, quatre mois après la quatorzième et dernière injection d'extrait acétonique, 2 cobayes (G et H) sont sacrifiés. L'un ne présente aucun ganglion hypertrophié, mais des tubercules sur la rate; l'autre a de gros ganglions inguinaux caséux et sous-lombaires et des lésions de la rate. Les lésions de ces 2 cobayes sont broyées et inoculées à 3 cobayes (Lot G et H).

4 autres cobayes traités et 3 cobayes témoins n'ont présenté aucune lésion.

Lot C. — 3 cobayes ont été inoculés sous la peau le 21 mars avec les lésions ganglionnaires du cobaye C, inoculé le 21 février avec 11 cent. cubes de filtrat et ayant reçu 7 injections d'extrait acétonique.

Un seul cobaye a présenté un ganglion inguinal hypertrophié contenant des bacilles de Koch.

Lot D. — 6 cobayes ont été inoculés sous la peau le 1^{er} mai avec les lésions ganglionnaires du cobaye D, inoculé le 21 février avec 11 cent. cubes de filtrat et sacrifié immédiatement après la série des 14 injections d'extrait acétonique.

Les 15 et 21 juillet, 2 cobayes meurent avec un ganglion inguinal caséux, contenant des bacilles de Koch.

Le 26 août, les 4 autres cobayes sont sacrifiés. Ils ont un abcès caséux au point d'inoculation sans hypertrophie du ganglion inguinal correspondant. Le ganglion sous-lombaire du même côté est hypertrophié. Le pus de l'abcès contient des bacilles de Koch. Il est inoculé sous la peau de 3 cobayes qui sont morts du 9 décembre 1930 au 3 janvier 1931 avec les mêmes lésions que les cobayes précédents : abcès caséux au point d'inoculation contenant des bacilles de Koch, absence de ganglion inguinal, ganglion sous-lombaire du même côté hypertrophié.

Lot E. — 6 cobayes ont été inoculés sous la peau le 1^{er} mai avec les lésions ganglionnaires du cobaye E, inoculé le 21 février avec 11 cent. cubes de filtrat et sacrifié trois semaines après la dernière injection d'extrait acétonique.

Le 7 août, 1 cobaye meurt avec des lésions ganglionnaires caséuses et des tubercules sur la rate et les poumons.

Le 26 août, les 5 autres cobayes sont sacrifiés, excepté l'un d'eux qui a un gros ganglion inguinal, les 4 autres n'ont qu'un abcès caséux au point d'inoculation.

Tous ont de gros ganglions sous-lombaires et des lésions tuberculeuses généralisées à la rate, au foie et aux poumons.

Lot F. — 3 cobayes ont été inoculés sous la peau, le 8 août, avec les

lésions ganglionnaires et spléniques du cobaye F, inoculé le 11 février avec 11 cent. cubes de filtrat de bacilles de Koch et sacrifié trois mois après la quatorzième injection d'extrait acétonique de bacilles tuberculeux.

Deux sont morts prématurément et le troisième le 9 septembre avec de gros ganglions inguinal et sous-lombaire droits caséux, contenant des bacilles de Koch et des lésions de la rate.

Lot GH. — 3 cobayes ont été inoculés sous la peau le 26 août avec les lésions ganglionnaires et spléniques des cobayes G et H, inoculés le 21 février avec 11 cent. cubes de filtrat et sacrifiés quatre mois après la quatorzième injection d'extrait acétonique de bacilles tuberculeux.

Ces cobayes sont morts entre le 21 octobre et le 6 décembre avec des lésions tuberculeuses généralisées à tous les organes.

Comme dans la première expérience, les cobayes qui n'ont reçu que 7 injections d'extrait acétonique ont présenté des lésions ganglionnaires localisées, sans extension aux organes. Réinoculés à d'autres cobayes, ces ganglions n'ont provoqué que dans un cas l'apparition des mêmes lésions.

Les cobayes qui, après avoir reçu 14 injections d'extrait acétonique, ont été sacrifiés immédiatement après la dernière injection n'ont été atteints, comme les animaux précédents, que de lésions ganglionnaires, mais dans certains cas caséuses. Réinoculées à d'autres cobayes, elles ont provoqué chez eux au point d'inoculation la formation d'un abcès caséux, dont le pus contenait des bacilles de Koch.

Cet abcès était rarement accompagné de l'hypertrophie du ganglion inguinal, mais toujours de celle du ganglion sous-lombaire correspondant.

Dans certains cas, les lésions étaient généralisées aux organes viscéraux.

Les cobayes, qui ont été sacrifiés plus de trois mois après la quatorzième injection d'extrait acétonique, ont présenté des lésions ganglionnaires et spléniques qui, réinoculées à des cobayes sains, leur ont donné des lésions généralisées aux divers organes.

On peut ainsi suivre tous les degrés de l'augmentation de la virulence des bacilles issus des éléments filtrables sous l'influence des injections de l'extrait acétonique de bacilles de Koch, puisque chez les cobayes non traités on n'observe qu'une simple hypertrophie du système lymphatique.

Ces résultats et ceux de la première expérience peuvent se traduire schématiquement de la façon suivante :

- 1°**
- Cobayes, ayant reçu en injection sous-cutanée environ 10 cent. cubes de filtrat de culture de bacilles de Koch, traités par 6 à 7 injections d'extract acétonique de bacilles tuberculeux et sacrifiés immédiatement après.
- Lésions ganglionnaires caséuses ou non caséuses, contenant des bacilles de Koch.
- Cobayes inoculés avec les ganglions des cobayes précédents.
- Lésions ganglionnaires moins prononcées, non caséuses, contenant des bacilles de Koch.
- 2°**
- Cobayes, ayant reçu en injection sous-cutanée environ 10 cent. cubes de filtrat de culture de bacilles de Koch, traités par 14 injections d'extract acétonique de bacilles tuberculeux et sacrifiés immédiatement après la dernière injection.
- Lésions ganglionnaires caséuses, contenant des bacilles de Koch.
- Cobayes inoculés avec les ganglions des cobayes précédents.
- Abscès caséux au point inoculé avec hypertrophie exceptionnelle du ganglion inguinal correspondant et constante du ganglion sous-lombaire.
- Dans certains cas, lésions généralisées aux organes.
- 3°**
- Cobayes, ayant reçu en injection sous-cutanée environ 10 cent. cubes de filtrat de culture de bacilles de Koch, traités par 12 à 14 injections d'extract acétonique de bacilles tuberculeux et sacrifiés de trois semaines à trois mois après la dernière injection.
- Lésions ganglionnaires caséuses et spléniques contenant des bacilles de Koch.
- Cobayes inoculés avec les ganglions des cobayes précédents.
- Lésions ganglionnaires caséuses et spléniques ou lésions généralisées aux organes.
- 4°**
- Cobayes, ayant reçu en injection sous-cutanée environ 10 cent. cubes de filtrat de culture de bacilles de Koch, traités par 14 injections d'extract acétonique de bacilles tuberculeux et sacrifiés quatre mois après la dernière injection.
- Lésions ganglionnaires caséuses et spléniques.
- Cobayes inoculés avec les ganglions des cobayes précédents.
- Lésions généralisées aux organes.

Dans chacune des expériences où les cobayes inoculés avec le filtrat de culture de bacilles de Koch ont été traités par des injections d'extrait acétonique de bacilles tuberculeux, un certain nombre d'animaux se sont comportés comme les témoins.

Il ne nous est pas possible de dire si ce fait est dû à une élimination précoce des éléments filtrables par l'organisme, ou à une absence d'action de l'extrait acétonique.

Pour éliminer toute cause possible d'erreur, des cobayes témoins ont reçu chaque fois les mêmes injections d'extrait acétonique que ceux inoculés préalablement avec les filtrats de cultures de bacilles de Koch. Aucun de ces animaux n'est devenu tuberculeux. Il ne pouvait pas en être autrement puisque les extraits acétoniques sont préparés avec des bacilles tuberculeux stérilisés à l'autoclave à 120°.

Il ressort donc de ces expériences que l'extrait acétonique de bacilles de Koch qui contient les substances ciro-graisseuses de ces bacilles est capable, lorsqu'il est injecté régulièrement sous la peau de cobayes inoculés avec les éléments filtrables du bacille tuberculeux, d'activer la reprise de leur virulence, puisqu'au premier passage on observe des lésions ganglionnaires caséuses et des lésions spléniques et au second passage des lésions généralisées à tous les organes.

ACTION DES EXTRAITS ACÉTONIQUES DE BACILLES PARATUBERCULEUX.

Nous avons répété les expériences précédentes avec des extraits acétoniques de bacilles paratuberculeux pour voir si les substances ciro-graisseuses de ces bacilles agissent sur l'ultravirus tuberculeux de la même manière que celles obtenues avec les bacilles virulents.

EXPÉRIENCE III. — 6 cobayes reçoivent le 18 janvier 1929, sous la peau de l'aîne droite, 9 cent. cubes de filtrat d'une culture de la souche bovine Vallée sur milieu de Sauton âgée de sept jours.

3 d'entre eux sont traités du 5 février au 19 mars par des injections sous-cutanées bi-hebdomadaires d'extrait acétonique de bacilles de la fiéole. Ils reçoivent au total douze injections. 3 sont conservés comme témoins.

Le 5 juillet, trois mois et demi après la dernière injection d'extrait acétonique, 1 cobaye traité est sacrifié. Ses ganglions inguinal et sous-lombaire

droits ainsi que ses ganglions trachéo-bronchiques sont légèrement hypertrophiés. Il est impossible d'y déceler des bacilles de Koch.

Les 2 autres cobayes traités meurent en décembre.

Ces derniers et les animaux témoins ne présentent aucune lésion des ganglions et des organes.

ACTION DE L'HUILE D'OLIVES SUR LES ÉLÉMENTS FILTRABLES DU BACILLE DE KOCH.

Nous avons recherché également si une matière grasse comme l'huile d'olives, dont les composants (palmitine, stéarine, oléine) se retrouvent dans les bacilles tuberculeux, agit comme les extraits acétoniques de ces bacilles.

EXPÉRIENCE. — Le 9 septembre 1930, 8 cobayes sont inoculés sous la peau de l'aine droite avec 10 cent. cubes de filtrat de culture de la souche Bovine-Vallée sur milieu de Sauton, âgée de sept jours.

6 d'entre eux ont été traités deux fois par semaine par des injections sous-cutanées dans l'aine droite de 1 cent. cube d'huile d'olives pure. Ils ont reçu au total 15 injections.

2 sont conservés comme témoins.

Le 8 octobre, 1 cobaye traité est sacrifié.

Le ganglion sous-lombaire droit est légèrement hypertrophié.

Bien qu'on n'y trouve pas de bacilles de Koch, il est broyé et inoculé à 5 cobayes qui sont morts du 8 novembre au 3 janvier 1931 sans présenter de lésions.

Les 10 et 14 octobre, 2 cobayes traités meurent.

Ils présentent des abcès dans l'aine droite, dont le pus ne contenait pas de bacilles. Inoculé à des cobayes sains, il n'a déterminé chez eux l'apparition d'aucune lésion, ce qui permet de penser que ces abcès étaient dus aux injections d'huile.

Le 19 novembre, un autre cobaye traité meurt.

Ses ganglions inguinal et sous-lombaire droits sont très légèrement hypertrophiés. On n'y trouve pas de bacilles de Koch.

Le 3 janvier 1931, les 2 cobayes traités survivants et les 2 témoins sont sacrifiés. Ils ne présentent aucune lésion.

Comme les extraits acétoniques de bacilles paratuberculeux, l'huile d'olives ne paraît pas exercer sur l'ultravirus tuberculeux la même action que les substances ciro-graisseuses des bacilles de Koch.

EMPLOI DES INJECTIONS D'EXTRAIT ACÉTONIQUE
DE BACILLES DE KOCH POUR LE DIAGNOSTIC
DES AFFECTIONS OÙ SE TROUVE L'ULTRA-VIRUS TUBERCULEUX.

Les expériences précédentes nous avaient démontré que les injections sous-cutanées d'extrait acétonique de bacilles de Koch permettent de mettre rapidement en évidence les propriétés pathogènes des bacilles acido-résistants qui dérivent des éléments filtrables du virus tuberculeux.

Nous avons pensé que le pouvoir activant de cet extrait pourrait être utilisé dans le diagnostic des affections où se trouve l'ultravirus tuberculeux.

EXPÉRIENCE. — Le 19 novembre 1930, M. Calmette reçoit de M. Lemoyne le liquide de pyopneumothorax d'un malade dans lequel le bacille de Koch n'a pas pu être décelé à l'examen microscopique et qui va subir l'opération de la thoracoplastie.

Ce liquide contient du staphylocoque en assez grande abondance. Après dilution dans de l'eau physiologique, il est filtré sur bougie Chamberland L2.

L'ensemencement du filtrat en bouillon et sur gélose ayant été négatif, celui-ci a été inoculé sous la peau de 6 cobayes.

3 d'entre eux ont été traités par des injections sous-cutanées bi-hebdomadaires d'extrait acétonique, 3 ont été conservés comme témoins.

Ceux-ci, sacrifiés le 19 février et le 16 mars 1931, n'ont présenté aucune lésion.

Les cobayes traités par des injections d'extrait acétonique, sacrifiés les 24 janvier, 16 février et 16 mars 1931, ont présenté tous trois une hypertrophie nette du ganglion inguinal correspondant au point d'inoculation, contenant des bacilles de Koch en grande abondance.

Chez les 2 derniers, la rate était hypertrophiée.

Les organes du cobaye sacrifié le 16 février ont été réinoculés à 3 cobayes, 2 sont morts prématurément. Le troisième, mort le 16 mars, présentait une hypertrophie des ganglions inguinaux avec présence de bacilles de Koch.

Nous avons conservé 4 cobayes qui avaient été inoculés avec le liquide non filtré.

Pour l'un d'eux, mort le 11 décembre avec une légère hypertrophie des ganglions sous-lombaires et trachéo-bronchiques, une réinoculation a été faite. Chez tous ces animaux, le dernier étant mort le 21 mars 1931, aucune lésion tuberculeuse n'a été constatée.

On peut donc affirmer que dans ce liquide de pyopneumothorax où le bacille de Koch n'a pu être décelé à l'examen microscopique, les inoculations n'ont pas permis de mettre en évidence un bacille tuberculeux de virulence normale.

Chez les cobayes inoculés simplement avec le filtrat de ce liquide et sacrifiés trois et quatre mois après l'inoculation, aucune hypertrophie gan-

glionnaire n'a été constatée et aucun bacille n'a été trouvé dans les ganglions.

Peut-être à cette date avaient-ils été déjà éliminés, comme on l'observe habituellement chez les animaux inoculés avec l'ultravirus tuberculeux.

Par contre, les cobayes ayant reçu la même inoculation et traités par des injections d'extrait acétonique et sacrifiés aux mêmes dates ont présenté une hypertrophie nette du ganglion inguinal avec présence de nombreux bacilles de Koch.

Cette expérience démontre donc nettement l'importance des injections d'extrait acétonique de bacilles de Koch pour la mise en évidence de l'ultravirus tuberculeux.

CONCLUSIONS.

Il ressort de ces expériences que les injections sous-cutanées d'extrait acétonique de bacilles de Koch favorisent le développement des lésions tuberculeuses chez les cobayes préalablement inoculés avec les éléments filtrables du bacille tuberculeux.

Après six à sept injections d'extrait acétonique, on observe l'apparition, au point d'inoculation du filtrat, chez la plupart des cobayes, de ganglions caséux ou non caséux, contenant des bacilles de Koch. Si les injections d'extrait acétonique ne sont pas poursuivies, ces lésions ne se généralisent pas. Réinoculées à des cobayes sains, elles déterminent chez ces derniers la formation de lésions ganglionnaires locales moins prononcées que chez les animaux précédents.

Réinoculées encore à d'autres cobayes, elles peuvent avorter.

Si les injections d'extrait acétonique sont continuées et répétées environ 14 fois, et si les cobayes traités sont sacrifiés à la fin des injections, ces derniers présentent au point d'inoculation des lésions ganglionnaires caséuses contenant des bacilles de Koch. Réinoculées à des cobayes sains, ces dernières provoquent la formation d'abcès caséux au point d'inoculation, avec hypertrophie exceptionnelle des ganglions inguinaux, hypertrophie constante du ganglion sous-lombaire correspondant, et, dans certains cas, lésions généralisées aux organes.

Lorsque les cobayes traités par 14 injections d'extrait acétonique sont sacrifiés de trois semaines à trois mois après la dernière injection, ils présentent des lésions ganglionnaires et

spléniques contenant des bacilles de Koch. Celles-ci réinoculées à d'autres cobayes déterminent chez eux l'apparition de lésions ganglionnaires et spléniques ou de lésions généralisées aux organes.

Enfin, s'ils ne sont sacrifiés que quatre mois après la dernière injection, les cobayes traités par l'extrait acétonique présentent aussi des lésions ganglionnaires et spléniques, mais celles-ci réinoculées à des cobayes sains produisent chez eux des lésions généralisées à tous les organes.

Cette action sur les propriétés pathogènes de l'ultravirus tuberculeux paraît appartenir surtout aux substances ciro-graisseuses des bacilles de Koch, car dans nos expériences les extraits acétoniques de bacilles paratuberculeux (bacille de la fléole) et une matière grasse, telle que l'huile d'olives, n'ont pas donné les mêmes résultats.

Chez les cobayes inoculés avec un produit pathologique, les injections sous-cutanées d'extrait acétonique de bacilles tuberculeux à raison de deux par semaine et répétées une quinzaine de fois semblent devoir être utilisées avec profit pour faciliter le diagnostic des affections que l'on a quelque raison de supposer dues à l'ultravirus tuberculeux.

*(Travail du laboratoire de M. le Professeur Calmette
à l'Institut Pasteur.)*

**SUR LA TECHNIQUE A EMPLOYER
POUR OBTENIR DES FILTRATS
CONTENANT DES ÉLÉMENTS FILTRABLES
DU VIRUS TUBERCULEUX**

par C. NINNI.

La fréquence des échecs signalés par les auteurs qui n'ont pas réussi à isoler l'ultravirus tuberculeux, en particulier des cultures, m'a conduit à rechercher quelles ont été les causes de ces échecs et quels moyens on peut employer pour les rendre plus rares.

Dans le laboratoire de M. Calmette, le procédé d'élection employé pour déceler l'ultravirus tuberculeux est celui dont la technique a été indiquée par M. Valtis. Il consiste à filtrer sur bougie Chamberland L2, pendant huit à dix minutes, sous dépression de 20 centimètres, des voiles de cultures jeunes développés sur milieu de Sauton. Ces voiles, décantés du milieu de culture, sont repris avec de l'eau physiologique et soigneusement émulsionnés avec des billes de verre. L'imperméabilité de la bougie est contrôlée par addition, au liquide à filtrer, d'un microbe très petit et facilement cultivable, tel celui du choléra des poules.

Cette méthode, bien qu'excellente et satisfaisante dans la plupart des cas, n'est pas toujours suffisante. Au cours de mes études sur la filtration, je me suis aperçu que certains produits pathologiques tuberculeux, et surtout certaines cultures, nécessitaient un traitement particulier si l'on voulait réduire au minimum les chances d'échec.

J'exposerai ci-après les conditions de préparation les mieux appropriées pour mettre en évidence l'ultravirus tuberculeux.

PREMIÈRE CONDITION (très importante).

Emploi de cultures jeunes et à développement rapide.

Déjà Valtis, Nègre, Boquet, M^{lle} Certoncini [1] et moi-même [2] avons constaté que les éléments filtrables du bacille de Koch sont plus aisément décelables dans les cultures âgées de une à trois semaines que dans les cultures plus anciennes. Mais cette condition n'est pas suffisante si la culture à filtrer n'est pas assez richement développée.

Ainsi, je n'ai jamais pu mettre en évidence l'ultravirus en utilisant des cultures d'une souche bovine-équine et d'une souche humaine dite Gutierrez, qui se développent très mal sur Sauton, que j'aie employé des cultures de huit jours ou de vingt jours, qui sont également grêles.

De même avec la souche Bovine-Vallée, dans laquelle on peut aisément déceler l'ultravirus lorsqu'on emploie un voile de huit jours bien développé sur Sauton, j'ai échoué toutes les fois que le voile était mal développé par suite d'une insuffisance de semence ou d'un abaissement de la température de l'étuve.

Cela prouve que l'ultravirus tuberculeux capable de donner naissance à des formes visibles apparaît exclusivement ou presque exclusivement pendant la multiplication rapide des bacilles ensemencés sur le milieu de Sauton.

On comprend dès lors la raison de la fréquence des échecs éprouvés par les auteurs qui, filtrant des voiles de cultures âgées de huit jours de souches quelconques, ont cru s'être placés dans les conditions observées dans notre laboratoire où nous employons des souches se développant rapidement. Cela répond également à ceux qui ont objecté que le milieu de Sauton n'est pas le mieux indiqué pour mettre en évidence les éléments filtrables du bacille de Koch.

Par la méthode des inoculations lympho-ganglionnaires, j'ai pu déceler l'ultravirus non seulement dans les voiles de cultures sur Sauton, mais aussi dans des cultures sur pomme de terre glycinée; mais, dans l'un comme dans l'autre cas, j'ai pris bien soin de vérifier si le développement de la culture était suffisamment abondant. Si la culture est riche, il importe peu de la filtrer après huit jours ou après vingt jours, car les

éléments filtrables une fois développés persistent au moins pendant quelque temps.

Si la culture est maigre, il est inutile de la filtrer, car on ne parviendra pas à en obtenir d'ultravirus.

Avant de procéder à des expériences de filtration, il sera donc nécessaire d'adapter la souche bacillaire au milieu nutritif quel qu'il soit, afin d'obtenir dans le plus bref délai (soit environ huit jours pour les souches de bacilles tuberculeux) une culture abondante. C'est ce qu'a fait de Blasio [3] dans notre laboratoire pour une souche de bacilles de lupus tuberculeux, qui n'a donné naissance à l'ultravirus que lorsque les bacilles s'étaient bien développés sur le milieu de Sauton, c'est-à-dire au troisième passage de Sauton en Sauton.

DEUXIÈME CONDITION. — *Agitation prolongée
des voiles ou des cultures sur pomme de terre.*

La méthode habituelle consiste à agiter pendant quelques minutes avec des billes de verre les voiles bien développés, afin de les rendre émulsionnables dans l'eau physiologique. Ces émulsions sont ensuite filtrées sur bougie Chamberland L2.

Cette préparation n'est pas toujours suffisante et je lui ai substitué la méthode suivante :

Les voiles de cultures sur milieu de Sauton ou les cultures sur pomme de terre sont agités avec des billes de verre et un peu de sable stérile (environ 0 gr. 25 par ballon) et avec 1/2 à 1 cent. cube d'eau physiologique, pendant dix à quinze minutes jusqu'à formation d'une très fine mousse sur les parois du ballon. Puis on ajoute 8 à 10 cent. cubes d'eau physiologique par ballon.

Ces émulsions peuvent être effectuées sans sable, mais elles sont alors beaucoup plus difficiles à filtrer que les émulsions préparées par agitation rapide.

Des essais comparés de recherche de l'ultravirus dans les filtrats obtenus après agitation brève et après agitation prolongée m'ont convaincu de l'importance de cette condition technique. J'ai également appliqué cette méthode avec avantage à quelques produits pathologiques tels que les crachats et les coagula fibrineux.

Ces différences dans les résultats tendent à démontrer que

l'ultravirus tuberculeux n'existe pas habituellement à l'état libre dans les cultures (c'est pourquoi on ne le recherche pas dans les milieux liquides) mais qu'il est adhérent soit aux bacilles, soit à la substance amorphe qui les unit.

TROISIÈME CONDITION.

Séjour des produits à filtrer à la glacière.

On peut filtrer immédiatement les émulsions de bacilles tuberculeux préparées comme il a été indiqué ci-dessus; mais, d'après mon expérience, il est préférable de réunir les produits bien agités et dilués dans un tube et de les laisser séjourner deux à trois jours à la glacière.

En opérant ainsi, le sable entraîne la plus grande partie des bacilles qui tombent au fond et restent agglutinés, alors que toute la colonne de liquide est louche.

Cette condition, qui nous a paru utile pour les cultures, — vraisemblablement parce que, pendant ce temps, l'ultravirus se détache des bacilles, — s'est montrée indispensable pour quelques produits pathologiques comme les crachats dilués, les urines et surtout les organes triturés à l'aide du broyeur de Borrel, et dilués avec 20 à 25 parties d'eau physiologique. Cela provient du fait que, si on cherche à autolyser les produits pathologiques, même purs, en les laissant séjourner à l'étuve pendant plus de vingt-quatre heures, l'ultravirus se détruit si bien qu'il ne peut plus être qu'exceptionnellement décalé.

La disparition de l'ultravirus est encore plus rapide si le produit est contaminé par d'autres microbes. En effet, les modifications de la réaction du milieu et la putréfaction initiale sont très défavorables à l'ultravirus. Je l'ai constaté avec quelques crachats et avec les urines de sujets tuberculeux laissés pendant trois jours à la température de la chambre (22°) ou à la glacière.

QUATRIÈME CONDITION (très importante).

Eviter le colmatage de la bougie.

Tous les auteurs insistent sur cette condition quand il s'agit de filtrer des produits albumineux plus ou moins dilués avec

de l'eau; mais personne ne s'en est préoccupé lorsqu'il s'agit de la filtration de cultures.

Par des expériences multiples, j'ai constaté que le meilleur moyen d'obtenir un liquide riche en ultravirus est de le filtrer d'abord sur papier-filtre. Le même produit, filtré directement sur bougie ou après filtration grossière sur papier-filtre, donne des résultats différents. Cela tient à ce que la bougie se colmate trop rapidement. On peut s'en rendre compte en observant la quantité de liquide qui traverse une bougie dans la première minute et dans les minutes suivantes pendant la filtration d'une émulsion bien agitée de culture.

Il semble qu'une bougie colmatée laisse seulement passer les molécules de très petites dimensions.

Si les éléments de l'ultravirus tuberculeux étaient aussi petits que les molécules des sels ou que les éléments de certains ultravirus tels que la peste aviaire, il serait à peu près indifférent de filtrer une culture grossièrement débarrassée de microbes ou non. Mais tout semble prouver, au contraire, que les éléments de l'ultravirus tuberculeux sont assez volumineux et que, par suite, ils ne passent à travers le filtre que si la bougie reste bien perméable et n'est pas colmatée, sans que les conditions physiques qui retiennent les microbes soient modifiées.

La plupart des échecs notés dans les travaux des expérimentateurs qui n'ont pas réussi à démontrer l'existence de l'ultravirus tuberculeux tiennent à cette condition fondamentale de la filtration : *éviter le colmatage de la bougie*.

Un des exemples les plus frappants à cet égard est celui de M. Ferranti [4] qui n'a réussi à mettre en évidence aucun bacille acido-résistant dans les ganglions lymphatiques cervicaux de cobayes inoculés par voie ganglionnaire avec le filtrat d'un crachat tuberculeux. C'est qu'il avait filtré ce crachat, préalablement broyé avec du sable, pendant dix heures, à une dépression de 30 centimètres de Hg. Il est évident que la bougie a été colmatée si la filtration d'un crachat a duré dix heures; l'eau plus ou moins salée et peut-être un peu d'albumine ont pu filtrer, mais certainement pas l'ultravirus tuberculeux.

En tenant compte des conditions que je viens d'exposer, j'ai réussi à réduire au minimum les échecs dans l'obtention de

l'ultravirus tuberculeux, surtout de celui qui provient des cultures. Dans mes expériences, j'ai employé pour déceler les bacilles acido-résistants issus de l'ultravirus la méthode d'inoculation lympho-ganglionnaire que j'ai exposée [5] et dont les travaux de Sanctis Monaldi [6], de Blasio [3], de Bonis [7], Manfredi [8], P. Veran [9], et E. Aubertin et V. Reynes [10] etc., ont démontré la grande valeur.

De ce qui précède il ressort :

Qu'il est nécessaire de tenir compte de certaines conditions de préparation des filtrats, lorsqu'on se propose d'y rechercher l'ultravirus tuberculeux ;

Qu'il faut surtout que les cultures destinées à être filtrées soient faites dans un milieu nutritif qui permette le développement rapide de la souche, et qu'il convient d'éviter le colmatage de la bougie pendant la filtration ;

Qu'il est très utile d'agiter longtemps les produits à filtrer et de les laisser séjourner deux à trois jours à la glacière avant la filtration.

On rend ainsi les liquides plus riches en ultravirus libre et on évite les changements de réaction qui sont nuisibles à la mise en évidence de l'ultravirus tuberculeux, en particulier dans les produits pathologiques.

(*Institut Pasteur et Fondation Forlanini.
Laboratoire de M. le Professeur Calmette.*)

BIBLIOGRAPHIE

- [1] VALTIS, NÈGRE, BOQUET et M^{lle} CERTONCINI. *Soc. de Biol.*, **97**, 1927, p. 1667.
- [2] C. NINNI. *Soc. de Biol.*, **103**, 1930, p. 591.
- [3] R. DE BLASIO. *Rinascenza Medica*, **8**, 1931, p. 126.
- [4] J. FERRANTI. *Bull. Ist. Ser. Milanese*, **9**, 1930, p. 683.
- [5] C. NINNI. *C. R. Acad. des Sciences*, **190**, 1930, p. 597.
- [6] T. DE SANCTIS MONALDI. *Revue de la Tuberc.*, **11**, 1930, p. 568.
- [7] N. DE BONIS. *Gazetta intern. di Med. e Chirurg.*, n° 2, 30 janvier 1931.
- [8] L. MANFREDI. *Revista sanitaria Siciliana*, **19**, n° 4, 1931.
- [9] P. VERAN. *Thèse de Doctorat de Paris*, 1931.
- [10] E. AUBERTIN et V. REYNES. *Soc. de Biol.*, **106**, n° 12, 1931, p. 1161.

EFFETS DES RÉINOCULATIONS SUCCESSIVES DE BCG CHEZ LE COBAYE

par L. BALOZET

Les inoculations successives de microbes vivants ou microbes morts à des animaux en état d'infection latente, naturelle ou provoquée par une première inoculation non mortelle, mais incomplètement guérie, ont généralement pour effet de déterminer des lésions focales de réactivation qui peuvent offrir une gravité suffisante pour amener la mort du sujet. Ces faits sont bien connus et il suffit de rappeler les exemples classiques.

Leclainche et Vallée (1) ont prouvé que l'inoculation d'un virus-vaccin contre le charbon bactérien, contre le charbon symptomatique, ou contre le rouget peut provoquer l'évolution de la maladie correspondante, restée latente.

M. Nicolle (2) a montré que, chez les cobayes guéris d'une infection expérimentale par le bacille morveux, l'inoculation ultérieure de ces mêmes bacilles, tués par l'alcool-éther, provoque dans certains cas le réveil de lésions latentes, soit au point primitivement inoculé, soit plus loin. Ce réveil peut ne pas se produire à la première réinoculation de bacilles morts, il ne se manifeste parfois qu'après une deuxième injection.

A. Boquet et L. Nègre (3) ont établi que l'inoculation unique d'une émulsion de culture de cryptocoques provoque l'édification d'un nodule qui grossit, s'ulcère et guérit. Mais si, avant la guérison complète de ce nodule, on pratique en d'autres points des inoculations successives de cultures de cryptocoques, on

(1) LECLAINCHE et VALLÉE : Les accidents consécutifs aux vaccinations. Leur pathogénie, leur prophylaxie. Ces *Annales*, 46, 25 août 1902, p. 614-624.

(2) M. NICOLLE : Etudes sur la morve expérimentale des cobayes. Ces *Annales*, 20, 1906, p. 625, 698 et 801.

(3) A. BOQUET et L. NÈGRE : L'infection, la sensibilisation et l'immunité dans la lymphangite épizootique des solipèdes. Ces *Annales*, 33, octobre 1919, p. 678.

provoque une réactivation du nodule, c'est-à-dire une réaction focale de plus en plus importante, qui aboutit à une extension de la lésion locale, puis à la généralisation de l'infection mycosique. Ces auteurs notent que le processus de cette infection « présente les plus grandes analogies avec le processus de l'infection tuberculeuse décrit par MM. Calmette et Guérin ».

Dans la tuberculose, en effet, MM. Calmette et Guérin (1) ont montré que « les animaux que l'on soumet à deux ou plusieurs réinfections successives par le tube digestif, répétées à court intervalle, ne guérissent jamais ; leurs lésions s'aggravent et évoluent rapidement vers la caséification ». Tandis que, lorsqu'ils ne sont soumis qu'à une seule infection assez ménagée, par la voie digestive, les lésions provoquées peuvent guérir et les sujets acquièrent une résistance marquée aux surinfections.

On sait que le BCG, lorsqu'il est inoculé sous la peau à des doses supérieures à 1 milligramme, peut provoquer, chez le cobaye, des abcès froids (d'autant plus constamment que la dose injectée est plus forte) « qui, après évacuation de leur contenu, guérissent spontanément et ne déterminent qu'une légère et fugace tuméfaction des ganglions voisins ». L'inoculation intrapéritonéale et l'inoculation intraveineuse de doses égales de BCG « font apparaître sur l'épiploon et le péritoine, ou dans les organes viscéraux (poumon, foie, rate), des nodosités tuberculeuses qui, après quelques mois, se résorbent et disparaissent sans que la santé de l'animal en soit altérée (2) ».

Nous nous sommes demandé si ces lésions sous-cutanées, péritonéales ou viscérales, temporaires, provoquées par le BCG, n'étaient pas susceptibles d'évoluer d'une façon progressive, sous l'influence de réinoculations importantes et répétées à de courts intervalles, et si, dans ce cas, la virulence du BCG ne pourrait être modifiée. En somme, par l'artifice des inoculations répétées, nous avons cherché à réaliser ce que de nombreux expérimentateurs ont tenté en vain : augmenter le pouvoir pathogène du BCG, exalter sa virulence.

(1) A. CALMETTE et C. GUÉRIN : Origine intestinale de la tuberculose pulmonaire et mécanisme de l'infection tuberculeuse, IIF^e mémoire. *Ces Annales*, 20, août 1906, p. 609.

(2) A. CALMETTE : La vaccination préventive de la tuberculose par le BCG. Rapport présenté à la Conférence internationale du BCG (15-18 octobre 1928). *Ces Annales*, 42, suppl. décembre 1928, p. 4.

Nous avons procédé à 5 séries d'expériences :

1° Inoculations intracardiaques suivies de réinoculations par la même voie ;

2° Inoculations intrapéritonéales suivies de réinoculations par la même voie ;

3° Inoculations sous-cutanées suivies de réinoculations par la même voie ;

4° Inoculation intracardiaque suivie d'inoculations hebdomadaires sous-cutanées ;

5° Inoculation intrapéritonéale suivie d'inoculations hebdomadaires sous-cutanées.

I. — INOCULATIONS INTRACARDIAQUES RÉPÉTÉES.

A. Calmette, A. Boquet et L. Nègre (1) ont signalé l'innocuité des réinoculations de BCG par la voie vasculaire quand celles-ci sont faites moins de trente jours après la première. Plus tardivement, les cobayes meurent souvent intoxiqués.

Voici nos expériences :

6 cobayes reçoivent, en injection intracardiaque, 5 milligrammes de BCG, dilué dans 1 cent. cube de liquide de Sauton au 1/4. Ces inoculations devaient être répétées à raison d'une par semaine, mais, à partir de la quatrième, ce délai a dû être augmenté.

La lecture du tableau I indique que les premières injections faites à une semaine d'intervalle provoquent une chute de poids très importante, alors que, dès que ces injections sont espacées de deux ou trois semaines, cet amaigrissement cesse.

1 cobaye est mort accidentellement au moment de la deuxième injection ; un autre au moment de la troisième.

Voici les observations détaillées de tous ces animaux, en commençant par ceux qui ont le moins longtemps survécu :

COBAYE N° 6. — Perte de 135 grammes entre la première et la deuxième inoculation. Mort accidentelle au moment de celle-ci (hémopéricarde).

COBAYE N° 7. — Avait toléré dans de meilleures conditions que ses congénères les deux premières injections. Est mort d'hémothorax pendant la troisième.

(1) A. CALMETTE, A. BOQUET et L. NÈGRE : Contribution à l'étude du bacille tuberculeux bilité. Ces *Annales*, 35, 1921, p. 561.

Pas de lésions macroscopiques, sauf une hypertrophie de la rate qui a le double de son volume normal. Les coupes du poumon et de la rate montrent les lésions macroscopiques décrites par Coulaud (1) chez le lapin.

COBAYE N° 14. — Mort le lendemain de la quatrième inoculation (22^e jour) après avoir perdu 200 grammes.

L'autopsie révèle une très grosse hypertrophie de la rate. Le poumon est entièrement parsemé de points blanchâtres.

Les coupes montrent les altérations suivantes : dans la rate, très nombreuses cellules épithélioïdes dans les sinus, dont la surface est augmentée par la congestion. Les cellules géantes sont assez nombreuses. Les cellules épithélioïdes manquent à peu près totalement dans les follicules lymphoïdes.

Le poumon présente des lésions microscopiques confluentes. Des cellules épithélioïdes infiltrent tout le tissu au point de modifier presque entièrement l'aspect habituel. Les cellules géantes à petit nombre de noyaux sont nombreuses. Quelques nodules lymphoïdes se rencontrent surtout au voisinage des bronches.

Le foie, peu modifié, renferme quelques follicules.

TABEAU I. — Inoculations intracardiaques répétées.
(Poids des cobayes en grammes.)

NUMÉRO des cobayes	DATES DES INOCULATIONS									
	29 octobre	4 novembre	12 novembre	18 novembre	3 décembre	9 décembre	16 décembre	6 janvier	13 janvier	20 janvier
5.	925	745	725	625	720	710	730	745	680	640
6.	920	785								
7.	950	865	875							
9.	875	720	700	645	680	675	710	615		
11.	790	690	690	635	640	630	660	625		
14.	835	715	690	635						
Totaux .	5.295	4.520	3.680	2.570	2.040	2.015	2.100	1.985	680	640
Moyennes.	882,5	733	736	642,5	680	671	700	661	680	640

COBAYE N° 11. — Mort au cours de la septième injection, d'hémithorax (68^e jour de l'expérience : 7 injections de 5 milligrammes = 35 milligrammes de BCG).

On note : hypertrophie ganglionnaire; rate légèrement augmentée de volume (3 gr. 75), sans altérations apparentes; poumons un peu densifiés.

Les lésions microscopiques du poumon sont moins importantes que celles du cobaye précédent; elles sont constituées par une infiltration un peu disséminée de cellules épithélioïdes avec quelques cellules géantes. Nodules lymphoïdes.

(1) E. COULAUD : Effets des injections intraveineuses massives de bacille bilié (BCG). Ces *Annales*, 41, 1927, p. 289.

Les coupes de la rate sont très analogues à celles du cobaye précédent.

Le foie, par contre, montre une réaction lymphoïde extrêmement importante, siégeant dans les espaces de Kiernan, et formant en dehors de petits follicules.

Cobaye n° 9. — Mort six heures après la septième injection (68^e jour de l'expérience : 7 injections de 5 milligrammes = 35 milligrammes de BCG).

On note : hypertrophie ganglionnaire généralisée ; rate énorme (27 grammes), pas d'altération apparente du foie ; les poumons paraissent hépatisés.

Les coupes histologiques du poumon montrent une réaction folliculaire lymphoïde importante, prédominante. Les cellules épithélioïdes et les cellules géantes sont moins nombreuses, à l'inverse de ce qui a été constaté pour les cobayes morts plus tôt.

La rate, distendue par la congestion, montre d'énormes lacs sanguins.

Le foie présente de nombreux follicules.

Cobaye n° 5. — Mort le lendemain de la huitième injection (82^e jour de l'expérience : 8 injections = 40 milligrammes de BCG).

Lésions macroscopiques : très grosse hypertrophie splénique (15 gr. 40) ; hypertrophie du foie, ganglions lymphatiques peu augmentés de volume ; poumons un peu densifiés.

Lésions macroscopiques. Poumon : lésions analogues à celles du cobaye n° 9 ; moins accusées. Rate : comme le cobaye précédent. Foie : follicules moins nombreux.

Les injections intracardiaques répétées de doses relativement élevées de BCG (5 milligrammes) provoquent donc la mort des cobayes après 3 à 8 injections.

Les lésions microscopiques que déterminent ces injections sont des follicules, toujours de petites dimensions, où prédominent d'abord les cellules épithélioïdes, puis les lymphocytes. On y trouve aussi des cellules géantes. Tous les éléments du tubercule vrai sont donc représentés, mais la disposition de ces éléments ne réalise jamais l'aspect classique. Ces lésions, produites par des injections massives intra-vasculaires de BCG, ont été très minutieusement décrites par Coulaud. La répétition des injections n'a permis de les modifier, ni dans leurs dimensions, ni dans leur évolution. Aucun point de caséification n'a été observé. La répétition des injections ne semble même pas avoir augmenté la densité des lésions viscérales qui paraît être la même, aussi bien après la troisième ou la quatrième injection qu'après la septième ou la huitième.

La mort des animaux d'expérience ne peut être attribuée aux lésions des organes. Elle doit être rapportée à des phénomènes toxiques, car tous les cobayes ont succombé le jour même ou le lendemain d'une inoculation.

II. — INOCULATIONS INTRAPÉRITONÉALES RÉPÉTÉES.

On sait que l'inoculation de BCG dans le péritoine, aux doses de 3 à 5 milligrammes au moins, provoque « une réaction épiploïque et mésentérique intense avec formation de petits amas nodulaires pédiculés, constitués au centre par une agglomération de bacilles et de polynucléaires, à la périphérie par des cellules macrophages noyées dans un réseau de cellules conjonctives (1) ».

Nous avons pratiqué sur 3 cobayes des réinoculations, à de courts intervalles, de 5 milligrammes de bacilles BCG. La mort est survenue en quarante-trois, cinquante-cinq et soixante-quatre jours, et semble avoir été provoquée, comme celle des cobayes de l'expérience précédente, par des phénomènes toxiques, car elle s'est produite le jour même ou le lendemain d'une inoculation. Le tableau II montre l'évolution du poids des animaux : un a augmenté, les deux autres ont diminué.

COBAYE N° 83. — Mort le cinquante-cinquième jour, huit heures après la septième injection (au total 35 milligrammes de BCG). Exsudat péritonéal abondant (10 cent. cubes), louche, rosé. Péritonite adhésive. Nodules tuberculiformes groupés en amas, à la surface de l'intestin grêle et dans l'épiploon. Quelques nodules isolés en divers points du péritoine viscéral et pariétal. Les ganglions de la cavité abdominale sont un peu tuméfiés; congestion du foie; congestion de la rate (4 gr. 55). Ganglions trachéo-bronchiques hypertrophiés.

Les coupes de ces lésions montrent une partie centrale constituée par des polynucléaires nécrosés, entourée par une zone assez importante de cellules épithélioïdes. Pas de réaction lymphocytaire périphérique, mais organisation du tissu conjonctif comme pour enkyster cette formation.

Un cobaye a été inoculé avec le produit de broyage de ces nodules. Sacrifié deux mois après, il était absolument indemne de toute lésion.

COBAYE N° 86. — Mort le soixante-quatrième jour, trente heures après la huitième injection (au total 40 milligrammes de BCG). Exsudat péritonéal abondant (20 cent. cubes), très louche, rosé. Péritonite adhésive très marquée soudant toutes les anses intestinales. Très nombreux nodules sur le péritoine pariétal et viscéral, dans l'épiploon, sur la surface de l'intestin, du foie, du diaphragme, de la rate. Adhérence entre le foie, la rate et les reins. Beaucoup de ces nodules contiennent du pus et de nombreux amas de bacilles acido-résistants. Hypertrophie des ganglions lymphatiques, surtout marquée pour ceux de l'abdomen et les prépectoraux.

(1) A. CALMETTE, A. BOQUET et L. NÈGRE. *Loc. cit.*

La coupe de ces lésions montre les mêmes caractères que celles du cobaye précédent, mais plus développées. Ces lésions peuvent être considérées comme intermédiaires entre un abcès banal et un tubercule. Elles ressemblent au premier par la présence, au centre, de pus constitué par des polynucléaires nécrosés et, à la périphérie, de cellules embryonnaires, au second par la présence d'une zone intermédiaire de cellules épithélioïdes et de quelques cellules géantes.

Les coupes de foie et de rate ont montré que les nodules ont une situation sous-capsulaire. Le tissu des organes n'a subi aucune modification dans sa partie profonde.

Deux cobayes ont été inoculés avec le broyage de ces lésions et avec le produit du raclage de la surface du péritoine pariétal. Sacrifiés trois mois après, l'un avait pris 155 grammes, l'autre 80 grammes; aucun des deux ne portait la moindre lésion, et leurs ganglions ne renfermaient aucun bacille acido-résistant. Ils n'ont pas réagi à une épreuve intradermique de tuberculine neuf jours après leur inoculation, mais ils ont donné une réaction positive le vingtième jour.

TABLEAU II. — **Inoculations intrapéritonéales répétées.**
(Poids des cobayes en grammes.)

NUMÉRO des cobayes	DATES DES INOCULATIONS							
	11 mars	18 mars	4 avril	15 avril	22 avril	29 avril	5 mai	14 mai
83	495	444	472	460	447	500	530	
86	780	806	832	813	735	740	772	642
87	735	692	693	648	650			

COBAYE N° 87. — Mort le quarante-troisième jour, vingt-quatre heures après la cinquième injection (au total 25 milligrammes de BCG). Adhérences péritonéales très développées, surtout entre les anses intestinales et la paroi abdominale antérieure; la plupart des anses grêles sont soudées. L'épiploon forme un bloc. Une tache blanche sur le bord inférieur du foie. Grosse tuméfaction des ganglions prépectoraux.

Mêmes caractères microscopiques des lésions que chez les cobayes précédents.

Un cobaye a été inoculé avec le raclage du péritoine, les ganglions prépectoraux et la tache du foie. Il a réagi faiblement à l'injection intradermique de tuberculine dix-sept jours après son inoculation. Aucune lésion n'a pu être constatée à l'autopsie.

Les inoculations répétées de BCG dans le péritoine ont donc provoqué une réaction importante de cette séreuse, caractérisée par une péritonite adhésive, l'enkystement des bacilles dans des nodules à centre caséux, mais ressemblant, cependant, plus à des abcès qu'à des tubercules.

Ces lésions ont pu acquérir un développement important;

malgré cela, elles sont restées limitées au péritoine, et ne se sont étendues ni dans la profondeur des viscères abdominaux, ni à la cavité pleurale. Inoculées à d'autres cobayes, elles n'ont provoqué sur ces animaux aucune modification apparente.

III. — INOCULATIONS SOUS-CUTANÉES RÉPÉTÉES.

A. Calmette, A. Boquet et L. Nègre (1) ont étudié l'effet de la répétition des inoculations sous-cutanées de BCG sur le cobaye. Voici ce qu'ils ont observé :

« Quatre cobayes qui avaient reçu une première fois 0 milligr. 5 de bacilles biliés sous la peau ont été soumis à une nouvelle injection de la même dose; également sous la peau, vingt-six jours plus tard. Cette seconde injection a déterminé chez tous l'apparition rapide (en quelques heures) d'un œdème volumineux, dur, puis d'un abcès fluctuant, atteignant le sixième jour le volume d'un pois, qui s'est résorbé dans la suite sans s'ulcérer.

« Avec de fortes doses, dépassant 1 milligramme, une seconde injection, faite vingt-six jours après la première, détermine toujours la formation d'un abcès qui se vide à l'extérieur, suppure en s'ulcérant et guérit en quatre à cinq semaines. »

TABLEAU III. — Inoculations sous-cutanées répétées.
(Poids des cobayes en grammes.)

DATES d'inoculation	NUMÉRO DES COBAYES			DATES d'inoculation	NUMÉRO DES COBAYES		
	2	68	82		2	68	82
11 mars . . .	513	593	588	17 juin . . .	750	735	835
18 mars . . .	576	592	637	24 juin . . .	790	745	865
4 avril . . .	605	632	667	2 juillet . . .	765	740	875
15 avril . . .	670	690	753	9 juillet . . .	755	740	875
22 avril . . .	640	685	735	16 juillet . . .	745	710	840
29 avril . . .	665	700	768	23 juillet . . .	740	725	880
5 mai . . .	670	680	758	29 juillet . . .	765	730	905
14 mai . . .	675	702	773	5 août . . .	745	735	895
21 mai . . .	735	735	810	12 août . . .	755	735	890
28 mai . . .	735	685	810	20 août . . .	765	725	865
3 juin . . .	755	715	825	26 août . . .	765	730	880
10 juin . . .	745	715	805	8 septembre .	800	810	890

(1) A. CALMETTE, A. BOQUET et L. NÈGRE. *Loc. cit.*

Par analogie avec la technique précédemment employée, nous avons effectué des inoculations de 5 milligrammes de BCG espacées en général d'une semaine. L'expérience a duré cinq mois et demi et 23 inoculations successives ont été pratiquées. Le tableau III, où sont notées les modifications du poids des animaux d'expérience, montre tout de suite que ces injections, malgré leur nombre et leur fréquence, ont été remarquablement bien supportées.

Les inoculations étaient faites en des points qui étaient notés afin d'observer l'évolution de chacune d'elles et éventuellement les réactions focales.

Les trois cobayes se sont comportés de façon presque identique. Voici ce qui a été observé :

Après l'injection, apparition d'un œdème assez étendu, se limitant, le deuxième ou le troisième jour, à une induration qui s'abcède en général, mais pas constamment.

Les premières inoculations ont provoqué un abcès qui s'est ouvert après trois ou quatre semaines. Par la suite, les abcès s'ouvraient généralement après une semaine. Il y a donc eu une accélération du processus d'élimination.

L'ouverture des abcès s'opérait presque toujours par un orifice de petite dimension, caché par les poils, qui se cicatrissait rapidement, en général en une semaine. Il a été exceptionnel de constater des plaies plus étendues. Elles n'ont jamais eu l'apparence ulcéreuse.

Les inoculations ultérieures n'ont jamais provoqué la moindre réaction à l'endroit des injections antérieures, ni sur les plaies en voie de cicatrisation, ni à l'emplacement des cicatrices : donc pas de réactions focales.

Les trois cobayes ont été sacrifiés deux semaines après la vingt-troisième inoculation. On pouvait s'attendre à trouver le tissu conjonctif sous-cutané parsemé de points scléreux aux endroits des inoculations. Il n'en a rien été. Aucune trace des 18 premières injections ne pouvait être trouvée. Seules les vingt et unième, vingt-deuxième et vingt-troisième inoculations étaient visibles sur l'un, les 5 dernières sur les deux autres.

Les viscères étaient absolument indemnes de toute lésion tuberculeuse. Les ganglions lymphatiques étaient tous augmentés de volume.

IV. — INOCULATION INTRACARDIAQUE SUIVIE D'INOCULATIONS SOUS-CUTANÉES RÉPÉTÉES.

Notre but était d'étudier l'action des réinoculations de BCG sur l'évolution des lésions par une première inoculation intracardiaque.

Deux groupes de 6 cobayes ont reçu une première inoculation de 10 milligrammes de BCG émulsionnés dans 2 cent.

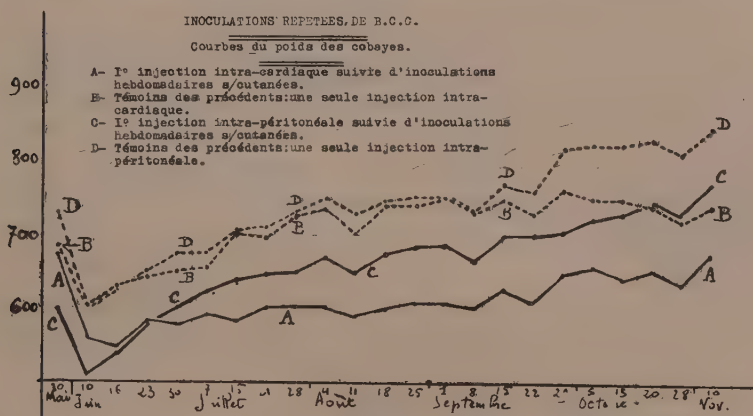


FIG. 1.

cubes de liquide Sauton au 1/4. Les animaux du groupe A reçoivent ensuite toutes les semaines 5 milligrammes de BCG sous la peau. Le groupe B servait de témoins.

Les courbes A et B de la figure 1 montrent que les variations du poids moyen des groupes sont sensiblement parallèles.

Après 22 inoculations sous-cutanées, cent soixante-sept jours après le début de l'expérience, les cobayes ont été sacrifiés ainsi que ceux de la série B, témoins.

Aucun d'eux n'avait la moindre lésion. Les inoculations sous-cutanées n'avaient modifié en rien la marche de la guérison.

V. — INOCULATION INTRAPÉRITONÉALE
SUIVIE D'INOCULATIONS SOUS-CUTANÉES RÉPÉTÉES.

Cette expérience fut poursuivie parallèlement à la précédente. Deux séries C et D de 6 cobayes chacune ont été constituées. Tous les cobayes ont reçu 10 milligrammes de BCG dans le péritoine le 30 mai. Ceux de la série C ont reçu depuis une injection hebdomadaire sous-cutanée de 5 milligrammes.

Un cobaye de la série C est mort vingt et un jours après la première injection après avoir subi un amaigrissement notable : 625 grammes le 30 mai, 490 le 10 juin, 405 le 16, 330 le 20 au moment de la mort dont la cause n'a pu être déterminée. Seules les lésions péritonéales dues au BCG ont été relevées. Inoculées à un autre cobaye, elles l'ont laissé indemne.

Les 5 autres cobayes de la série C et ceux de la série D ont eu leur poids en augmentation régulière (voir courbes C et D de la figure 1).

Sacrifiés après cent soixante-sept jours, leur autopsie a donné lieu aux constatations suivantes :

Série C. — Cobaye n° 32, pas de lésions.

Série C. — Cobaye n° 33, pas de lésions.

Série C. — Cobaye n° 34, pas de lésions.

Série C. — Cobaye n° 51, pas de lésions.

Série C. — Cobaye n° 93, pas de lésions.

Série D. — Cobaye n° 40, plusieurs abcès caséux dans l'épiploon.

Série D. — Cobaye n° 42, un abcès caséux dans l'épiploon.

Série D. — Cobaye n° 43, plusieurs abcès caséux dans l'épiploon.

Série D. — Cobaye n° 46, plusieurs abcès caséux dans l'épiploon.

Série D. — Cobaye n° 48, pas de lésions.

Série D. — Cobaye n° 49, pas de lésions.

Il semble donc que les injections sous-cutanées de BCG, loin d'aggraver les lésions péritonéales produites par une inoculation antérieure de ces mêmes germes, favorisent, au contraire, leur résorption.

CONCLUSIONS.

Les inoculations intracardiaques répétées de BCG au cobaye et les inoculations intrapéritonéales répétées ne modifient ni la virulence de ce bacille-vaccin, ni les caractères histologiques

des lésions produites par la première inoculation. La mort des animaux, qui survient fréquemment après les réinoculations intracardiaques, paraît être due à des phénomènes toxiques.

Les inoculations sous-cutanées répétées provoquent des abcès qui, à partir de la troisième ou de la quatrième injection, s'ouvrent un peu plus vite. Mais leur guérison est rapide et aucune réaction focale n'est constatée.

Les inoculations sous-cutanées répétées succédant à une inoculation intracardiaque n'empêchent pas la guérison des lésions produites par la première injection, guérison qui a été reconnue complète cent soixante-sept jours après.

Lorsque ces inoculations sous-cutanées répétées succèdent à une inoculation intrapéritonéale, elles semblent favoriser la guérison des nodules produits par la première inoculation.

Ces expériences démontrent, une fois de plus, l'absence totale de propriétés pathogènes du BCG pour le cobaye. Elles s'ajoutent aux nombreuses et vaines tentatives déjà effectuées par beaucoup d'expérimentateurs en vue de restituer au BCG tout ou partie de la virulence originelle du bacille bovin dont il est issu.

*(Laboratoire de Recherches du Service de l'Elevage
à Casablanca.)*

LE PHÉNOMÈNE DE TWORT ET LA BACTÉRIOPHAGIE,

par M. F. D'HÉRELLE.

Dans un Mémoire intitulé *Le Phénomène de Twort et le Phénomène de d'Hérelle*, publié dans ces *Annales* (1), Gratia, après avoir rapporté diverses expériences réalisées par lui dans le but de montrer que les deux phénomènes sont provoqués par le même principe, suivant les conditions de l'expérience, et avoir rappelé qu'il avait produit des cultures à l'appui de sa théorie lors du Congrès annuel de la *British Medical Society* en 1922, ainsi qu'au cours d'une séance du I^{er} Congrès de la Société Internationale de Microbiologie, écrit ce qui suit :

« Malgré l'évidence de cette démonstration, d'Hérelle ne s'incline pas et maintient que ce que je montre n'est pas le phénomène de Twort.

« Tandis qu'après la séance du Congrès je montrais mes tubes à d'Hérelle en particulier, il m'objecta (2) : « *Aucun de vos tubes, qu'il s'agisse d'une traînée de clarification ou de taches, ne montre l'extension de la transformation vitreuse à toute la culture.*

« Or, Twort indique que si l'on touche une culture normale de microcoque sensible avec une trace du « matériel trans-parent » provenant d'une colonie vitreuse, la culture, au point touché, devient transparente, et la transformation s'étend ensuite sur toute la culture.

« *Aucun de vos tubes ne montre cette extension de la transformation vitreuse, dit-il, et pour ma part, jamais en touchant avec du bactériophage, en un ou plusieurs points, une culture sur gélose de staphylocoque sensible, je n'ai obtenu la moindre transformation de culture ni, à plus forte raison, la moindre extension du processus.* »

(1) 46, 1931, p. 1.

(2) Pour éviter une équivoque possible de la part du lecteur, je mets en italique les paroles que Gratia me prête.

« Tout cela est parfaitement exact. Twort, en effet, décrit cette extension du processus de transformation et mes tubes ne la montrent pas ou à peine. L'objection avait quelque pertinence; d'Hérelle, contre toute évidence, allait-il avoir raison ?

« Nous allons voir qu'il n'en est rien. Avec du bactériophage, j'avais reproduit le matériel vitreux de Twort, cela seul était essentiel. Quant à l'extension du phénomène, c'était un point secondaire seulement quantitatif et qui dépendait probablement de conditions expérimentales. »

Je suis parfaitement d'accord avec Gratia en ce qui concerne cette dernière phrase : l'essentiel, c'est de reproduire le matériel vitreux de Twort. Je crois, d'ailleurs, que nous sommes bien près d'être d'accord en tout, Gratia et moi, car s'il trouve que j'aurais eu quelque raison de soutenir que les deux phénomènes étaient distincts du moment que ses expériences ne reproduisaient que *quantitativement* le phénomène de Twort, il doit être tout disposé à admettre que les deux phénomènes sont complètement différents s'il lui est démontré que ses expériences, tant anciennes que nouvelles, ne reproduisent en quoi que ce soit le phénomène de Twort, c'est-à-dire qu'il ne peut provoquer la formation, avec un bactériophage quelconque, du matériel vitreux de Twort.

L'objection que Gratia me prête et que j'ai reproduite plus haut est en réalité secondaire. L'objection fondamentale que j'ai faite aux expériences de Gratia, et que je lui ai répétée de vive voix, ne se rapporte pas à des détails quantitatifs, je lui ai dit : « Ce que vous présentez comme étant le phénomène de Twort ne l'est pas. Vos tubes contiennent, non pas le matériel vitreux de Twort, mais une culture secondaire. »

Twort (1) a très minutieusement décrit le phénomène qu'il a observé et qui consiste essentiellement et uniquement en une transformation en série des bactéries en fins granules se colorant en rouge par le Giemsa. Le phénomène de transformation terminé, il reste sur la surface de la gélose une couche vitreuse, formée en totalité de ces fins granules *qui ne sont cultivables sur aucun milieu*. Ce dernier caractère a semblé tellement important à Twort, et avec raison puisque c'est là tout le

(1) *The Lancet*, 2, 1915, p. 1241.

phénomène, qu'il a vainement essayé de les cultiver dans de très nombreux milieux, ce dont il fait mention explicite.

J'ai recommencé toutes les expériences décrites par Gratia, y compris celle qu'il relate dans le Mémoire auquel je réponds ici ; j'ai moi-même tenté des expériences variées dans le but de voir s'il était possible d'obtenir dans des conditions spéciales la transformation vitreuse de Twort au moyen d'un bactériophage, je n'ai jamais réussi. Ce qu'on obtient, ce que Gratia a obtenu, et a confondu avec la couche vitreuse du phénomène de Twort, ce sont des *cultures secondaires* de bactéries résistantes au bactériophage : la couche plus ou moins fine examinée au microscope montre uniquement des bactéries parfaitement colorables, morphologiquement semblables aux bactéries de la culture primaire ; ces bactéries sont repiquables sur les milieux les plus simples, tel le bouillon gélosé ordinaire.

En résumé, Twort a décrit un phénomène en série qui consiste en une transformation des bactéries en fines granulations désormais incultivables.

J'ai décrit sous le nom de bactériophagie un phénomène en série qui consiste en une dissolution *totale* des bactéries, sans résidu. J'ai montré que le principe qui provoque le phénomène est essentiellement variable, notamment en ce qui touche son pouvoir de provoquer la dissolution des bactéries, mais, même avec des bactériophages qui n'ont qu'une action partielle, il ne se produit jamais de désagrégation partielle de bactéries en granules : l'action est plus ou moins complète suivant le *nombre* de bactéries dissoutes et la rapidité de formation de la culture secondaire. Les bactéries sont susceptibles de résister au principe qui provoque la bactériophagie, il se produit alors une culture secondaire, composée de bactéries morphologiquement semblables à celles de la culture primaire.

Gratia a confondu la culture secondaire avec la couche vitreuse granulaire de Twort : un simple examen microscopique suffira pour qu'il en acquière la preuve.

(Yale University School of Medicine,
New Haven, Conn. U. S. A.)

LE PHÉNOMÈNE DE TWORT ET LA BACTÉRIOPHAGIE (RÉPONSE A M. D'HÉRELLE).

par ANDRÉ GRATIA.

Je puis affirmer que j'ai bien obtenu avec le bactériophage du staphylocoque la matière vitreuse de Twort avec toutes ses caractéristiques, notamment sa *stérilité*, sa *propagation*, sa *transmissibilité* et *non pas uniquement des cultures secondaires résistantes*, comme le croit d'Hérelle.

Il y a longtemps que j'ai examiné au microscope, comme d'Hérelle m'y invite, la matière vitreuse transparente que j'ai

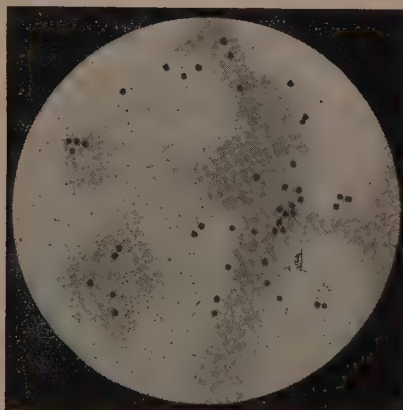


FIG. 1. — Matériel vitreux de Twort coloré par la méthode de Gram. (A titre de comparaison, quelques cocci résistants Gram positifs, isolés dans la masse amorphe, Gram négative du matériel vitreux.)

largement obtenue en masses abondantes et envahissantes lorsque j'observais les conditions précisées dans mon dernier mémoire. Lorsqu'on la colore par la méthode de Gram on constate qu'elle est constituée, non pas comme le dit d'Hérelle, par des microbes résistants, si ce n'est quelques rares éléments isolés, mais bien par une masse amorphe vaguement granuleuse et ne prenant pas le Gram (fig. 1). Lorsqu'on la colore par la méthode préconisée par Borrel, on constate que cette

masse amorphe est constituée en abondance de ces minuscules grains rosés dont Borrel a fait la démonstration au 1^{er} Congrès



FIG. 2. — Matériel vitreux de Twort pur, coloré par la méthode de Borrel.

de Microbiologie en juillet dernier, et qui, selon lui, seraient le « virus bactériophage » (fig. 2).

Il n'y a aucune confusion possible entre ce matériel vitreux et les cultures secondaires (fig. 3). Si, comme il ressort de la

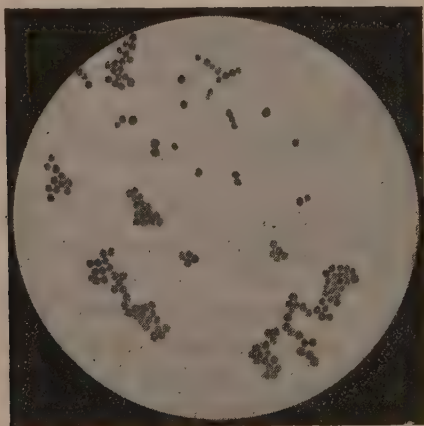


FIG. 3. — Culture résistante, colorée par la méthode de Borrel.

note de d'Hérelle, cet auteur a trouvé après l'action du bactériophage, « uniquement des bactéries parfaitement colorables,

morphologiquement semblables aux bactéries de la culture primaire et repiquables sur les milieux les plus simples, tel le bouillon gélosé ordinaire », c'est tout simplement, de l'aveu même de d'Hérelle, qu'il n'a pas réussi à reproduire le matériel vitreux de Twort; mais cela n'est pas une raison suffisante pour en conclure que je n'y ai pas réussi non plus et que je le confonds avec une culture secondaire !

Je n'avais pas cru devoir ajouter ces documents complémentaires au mémoire auquel d'Hérelle vient de répondre, tant la démonstration par ailleurs me paraissait déjà plus que suffisante.

*(Laboratoire de bactériologie de la Faculté de Médecine
de Bruxelles.)*

RECHERCHES SUR L'ORIGINE DU BACTÉRIOPHAGE DU STAPHYLOCOQUE

par ANDRÉ GRATIA.

La découverte faite par Twort [1] en 1915, dans la lymphe vaccinale, d'un agent bactériolytique pour le staphylocoque et que j'ai pu identifier en 1920 au bactériophage [2], est un fait extrêmement curieux.

Avec l'espoir de trouver peut-être un facteur constant qui pourrait nous éclairer sur la genèse du phénomène, j'ai entrepris une petite enquête sur la présence du bactériophage du staphylocoque dans un assez grand nombre de lymphes vaccinales de diverses origines. Bien que je ne sois arrivé jusqu'à présent à aucune conclusion satisfaisante concernant le but même de cette recherche, je pense devoir relater brièvement les principaux résultats de cette enquête.

Je me suis adressé à de nombreux producteurs de vaccine en Europe et en Amérique et j'ai reçu de nombreux échantillons, soit directement, soit grâce à l'obligeant intermédiaire du D^r Simon Flexner, directeur de l'Institut Rockefeller et du D^r Ledingham, du Lister Institute. Je remercie bien vivement tous ceux qui nous ont ainsi aimablement fourni le matériel nécessaire. Voici la liste des échantillons que j'ai soumis à l'analyse.

1. *Strasbourg*. Pulpe brute récoltée le 27 mars 1930 sur le veau n° 34.

2. *Dresde*. Pulpe brute récoltée le 4 avril 1930.

3. *Madrid*. Virus, glycériné au 1/5, de testicule de lapin; passage n° 110, du 4 avril 1930.

4. *Madrid*. Neuro-vaccine, glycérinée au 1/8, de lapin; passage n° 309, du 22 avril 1930.

5. *Madrid*. Pulpe, glycérinée au 1/5, de veau, n° 2118, récoltée le 20 juin 1929.

6. *Boston*. Pulpe brute fraîche, n° 819, récoltée le 25 avril 1930.

7. *Boston*. Pulpe brute sèche, n° 821, récoltée le 15 mai 1930.

8. *Pearl River* (U. S. A.) (Lederle antitoxine C°). Pulpe brute sèche n° 1255.

9. *Philadelphie* (Mulford C°). Pulpe brute sèche, en poudre, n° A 98 X, récoltée le 17 avril 1930.

10. *Indianapolis* (Eli Lilly C°). Pulpe fraîche, n° 34039.

11. *New Brunswick* (N. Y.) (Squibb and Sons). Pulpe sèche, en poudre, récoltée le 5 mai 1930.

12. *Paris*. Pulpe brute fraîche de lapin.

13. *Vienne*. Pulpe brute fraîche, n° K 13, récoltée le 5 mai 1930.

14. *Vienne*. Pulpe brute fraîche, n° K 14, récoltée le 5 mai 1930.

15. *Vienne*. Pulpe brute fraîche, n° K 15, récoltée le 5 mai 1930.

16. *Cologne*. Pulpe brute fraîche.

17. *Londres* (Lister Institute). Pulpe brute fraîche.

Pour faire la recherche du bactériophage, j'ai utilisé la technique suivante.

On introduit dans un flacon stérile bouché à l'émeri et contenant des perles de verre un volume de lymphé vaccinale gros comme une noisette. On y ajoute 5 cent. cubes de bouillon stérile et on agite à la machine à secouer jusqu'à ce que l'on obtienne une émulsion homogène. Avec 1 goutte d'émulsion on fait un isolement par ensemencements successifs sur 4 tubes de gélose inclinée selon la technique de Roux. Puis on ajoute environ 30 cent. cubes de bouillon au flacon contenant l'émulsion de lymphé vaccinale et on laisse le tout à l'étuve pendant quarante-huit heures.

Après deux jours, on examine les isolements et on repique en bouillon trois ou quatre colonies bien normales de microcoques différents, blancs ou dorés, que l'on peut nettement distinguer dans les derniers tubes d'isolements. Ce sont les souches que l'on soumettra à l'action du filtrat obtenu, d'autre part, en centrifugeant d'abord, puis en filtrant sur bougie Chamberland L 3, le bouillon dans lequel l'émulsion de lymphé vaccinale a séjourné pendant quarante-huit heures à 37°.

Les 3 ou 4 souches isolées à partir de l'échantillon soumis à l'analyse, ainsi qu'une souche de microcoque blanc ultra-sensible que j'ai jadis isolée de la lymphe vaccinale de Bruxelles, le staphylocoque V, sont alors ensemencées chacune respectivement dans 2 tubes contenant 5 cent cubes de bouillon. Le premier tube sert de témoin, le second est additionné de 1 cent. cube de filtrat de lymphe vaccinale. Le plus souvent on constate dès le lendemain que le second tube de staphylocoque V, celui qui contient du filtrat, est complètement clarifié; parfois aussi le second tube de l'une ou l'autre des autres souches l'est également, plus ou moins, dès ce premier passage. On procède ensuite pour chaque souche, à un certain nombre de passages (en général cinq) jusqu'à ce que l'on ait vu les souches qui se lysent et celle qui ne se lysent pas.

Il résulte de cette enquête que j'ai pu trouver le bactériophage du staphylocoque dès une première analyse, dans tous les échantillons de lymphe vaccinale essayés, sauf deux, c'est-à-dire quatorze fois sur seize échantillons. Il est vraisemblable d'ailleurs qu'il suffirait de refaire cette recherche avec les deux échantillons négatifs pour y trouver aussi du bactériophage.

Nous voyons d'autre part que l'unique pulpe récoltée sur le lapin et provenant de Paris est restée négative ainsi que la vaccine cérébrale et testiculaire de Madrid, malgré des essais répétés. On peut donc en déduire que le virus vaccinal pur n'est pour rien dans la lyse transmissible du staphylocoque. Au cours de ces analyses, je n'ai que très exceptionnellement trouvé dans les isollements (2 fois seulement), des colonies présentant d'emblée la transformation vitreuse; il en résulte que la technique que j'ai employée pour rechercher le bactériophage donne des résultats supérieurs à ceux obtenus par la méthode qui révéla le phénomène à Twort et que j'avais employée dans mes toutes premières recherches en 1920, ainsi que Bruynoghe et Maisin [3] dans la suite.

Cela ne veut nullement dire que, comme le prétend d'Hérelle, le phénomène de Twort et le phénomène de d'Hérelle soient différents et dus à des agents différents pouvant coexister ou non dans la lymphe vaccinale. Dans des travaux antérieurs [4], j'ai réfuté cette opinion. D'ailleurs des échantillons de lymphe vaccinale dont l'isolement n'avait révélé aucune colonie vitreuse

m'ont donné des bactériophages avec lesquels je pouvais à volonté réaliser la transformation vitreuse de Twort; c'est le cas notamment pour la lymphe vaccinale fournie par la Lederle Compagnie dont le bactériophage est ce BLS qui m'a servi pour démontrer l'identité du phénomène de Twort et du phénomène de d'Hérelle dans mon dernier travail paru ici même en janvier 1931 [4].

Aux bactériophages que j'ai isolés au cours de cette enquête, il importe d'ajouter celui que j'ai pour la première fois isolé de la pulpe vaccinale à New-York en décembre 1920, le B. H; celui que j'ai isolé, déjà par la technique actuelle, de la pulpe vaccinale de Bruxelles, en octobre 1921, le BV; tous deux encore conservés actifs aujourd'hui; celui que j'ai obtenu en 1922, par la méthode des exsudats péritonéaux de Bordet et Ciuca, et celui isolé, en 1922 également, d'un abcès fermé de la face chez un enfant [5]. Ces deux derniers n'ont pas été conservés. Enfin, j'ai récemment trouvé un dernier bactériophage, le B. K., dans une culture de staphylocoque isolée d'un anthrax et qui manifestait des signes de transformation vitreuse. Signalons à ce propos que seule la partie tout à fait inférieure, très épaisse et humide de la gélose inclinée montrait nettement cette vitrification de la culture. Cette partie repiquée en bouillon ne donnait naissance à aucune culture et le bouillon ainsiensemencé devenait lytique. En repiquant en bouillon le matériel prélevé sur la partie moyenne du tube, on obtenait une culture apparemment normale, mais qui, repiquée à son tour en bouillon, ne poussait plus et qui a d'ailleurs elle-même fini par se dissoudre complètement. Enfin le matériel récolté dans la partie tout à fait supérieure et desséchée de la gélose inclinée a donné une culture normale qui ne s'est pas dissoute et à partir de laquelle j'ai pu isoler le staphylocoque tout à fait normal, non lysogène et parfaitement sensible. Ceci montre une fois de plus le rôle important de l'humidité dans la régénération du bactériophage, notion mise jadis en évidence par d'Hérelle et Pozerski [6] et sur laquelle Twort a encore tout récemment insisté comme une des conditions essentielles de son phénomène [7].

On constate donc que l'on peut trouver le bactériophage du staphylocoque ailleurs que dans la pulpe vaccinale, et d'Hérelle,

Callow [8] et d'autres l'ont également trouvé occasionnellement dans des pus de panaris ou de furoncles; mais on peut dire que sa présence dans la lymphe vaccinale de veau est pratiquement constante et que cette constance est telle qu'on peut retrouver toujours le même bactériophage dans des échantillons d'une même vaccine récoltée à plusieurs années d'intervalle; c'est ainsi que l'on retrouve aujourd'hui dans la pulpe vaccinale de Bruxelles le même bactériophage B. V. que j'y avais déjà trouvé en 1922 et retrouvé à plusieurs reprises pendant les années suivantes et que Bordet et Renaux y ont encore retrouvé en 1928 [9].

Il est à signaler que, parallèlement, on réisole aussi chaque fois cette même souche de staphylocoque blanc V. ultra-sensible et qui offre, d'ailleurs, certains caractères qui le rendent parfaitement reconnaissable.

Cette présence constante du bactériophage du staphylocoque dans la pulpe vaccinale entretenue en série sur la peau des génisses, tandis que sa présence n'a jamais été signalée dans les matières fécales, montre que le bactériophage n'a pas nécessairement l'intestin comme lieu d'origine. En vérité, on trouve le bactériophage là où le microbe séjourne avec prédilection, c'est-à-dire dans l'intestin lorsqu'il s'agit de microbes intestinaux comme les bactéries du groupe coli-typhique-dysentérique ou comme le choléra; dans les lésions cutanées, et particulièrement les lésions cutanées entretenues en séries, pour les microbes de la peau comme les staphylocoques.

Il est, enfin, un point qui nous paraît d'une certaine importance théorique et pratique, c'est que l'on peut diviser ces différents bactériophages en deux groupes principaux. D'une part, un premier groupe de bactériophages se caractérisant surtout par le fait qu'ils sont *polyvalents*, c'est-à-dire qu'ils sont actifs sur tous les staphylocoques, dorés, citrins ou blancs, pathogènes ou saprophytes. On constate qu'en dernière analyse il n'y a qu'un nombre extrêmement restreint de staphylocoques résistant à ces bactériophages et, encore, ne sont-ils pas absolument réfractaires. J'y reviendrai, d'ailleurs, dans un prochain travail.

Les bactériophages de ce premier groupe sont rares. On les trouve parfois dans la vaccine, occasionnellement dans des furoncles, des anthrax, des panaris. On doit y ranger le bacté-

riophage B. H. isolé de la pulpe vaccinale à New-York en 1920. le bactériophage B. L. récemment isolé de la lymphe vaccinale du Lister Institute de Londres, le bactériophage B. K. récemment isolé d'un anthrax de la nuque, bactériophages que l'on possède encore tous trois aujourd'hui. Il faut y ajouter deux bactériophages obtenus tous deux, en 1922, et que je n'ai pas conservés, l'un d'un abcès fermé de la face chez un enfant, l'autre par la méthode des exsudats péritonéaux de Bordet et Ciuca.

Quant au second groupe, il comprend la grande majorité des bactériophages que j'ai isolés, soient douze sur dix-sept. On les trouve très facilement dans presque toutes les pulpes vaccinales. Contrairement aux bactériophages du premier groupe, ceux du second groupe, tout en étant extrêmement actifs, ont un champ d'action limité ne s'étendant qu'à quelques souches de staphylocoques blancs, également isolés des pulpes vaccinales, notamment le staphylocoque très sensible, V. Pour cette raison et par opposition à ceux du premier groupe, je les appellerai *monovalents* (Voir tableau I).

Les deux groupes de bactériophages ne se distinguent pas seulement par l'étendue de leur champ d'action, mais encore par leurs propriétés antigéniques. Déjà dans des notes anciennes [10], j'ai montré que l'on pouvait distinguer aisément le B. H. polyvalent du B. V. monovalent par l'action neutralisante des sérums antibactériophages correspondants. Le sérum anti-B. H., par exemple, neutralise complètement le B. H. et partiellement le B. V.

L'on peut étendre aujourd'hui cette notion à tous les bactériophages du premier groupe par rapport à tous les bactériophages du second groupe.

Un sérum préparé contre un bactériophage du premier groupe, le B. H. ou le B. L., par exemple, neutralise complètement les bactériophages du premier groupe (B. H., B. L., B. K.) et ne neutralise que faiblement ceux du second (B. L. S., B. Col., B. D., B. V. 15, etc.). Réciproquement, un sérum préparé contre un bactériophage du second groupe, le B. L. S. par exemple, neutralise complètement tous les bactériophages de ce groupe (B. L. S., B. Col., B. D., B. V. 13, etc.) et n'a qu'une action très partielle sur les bactériophages du premier

groupe B. H. ou B. L.). On serait en somme porté à croire qu'il n'y aurait, en réalité, au lieu de cette quinzaine de bactériophages différents, que deux bactériophages staphylococciques seulement. Tous les bactériophages du premier groupe ne seraient qu'un seul et même bactériophage polyvalent et, de même, tous ceux du second groupe ne seraient qu'un seul

TABLEAU I.

ORIGINE	BACTÉRIOPHAGES isolés	ACTION sur les Staphylocoques blancs : V, Bfr2, BS3, HC, LS1, Md1, V13-2, V14-3, V15-2	ACTION sur les Staphylo- coques dorés
<i>Premier groupe.</i>			
1 ^o Vaccine New-York . .	B. H. : décembre 1920.	+	+
2 ^o Vaccine Londres . .	B. L. : avril 1930.	+	+
3 ^o Anthrax	B. K. : octobre 1930.	+	+
4 ^o Exsudat péritonéal .	Perdus : novembre 1921.	+	+
5 ^o Absès face	Perdus : décembre 1920.	+	+
<i>Deuxième groupe.</i>			
6 ^o Vaccine Bruxelles . .	B. V. : décembre 1921.	+	—
7 ^o Vaccine Strasbourg .	B. S. : juillet 1930.	+	—
8 ^o Vaccine Dresde . . .	B. D. : juillet 1930.	+	—
9 ^o Vaccine Madrid . . .	B. Md. : juillet 1930.	+	—
10 ^o Vaccine Boston n ^o 819.	B. Bfr. : juillet 1930.	+	—
11 ^o Vaccine Boston n ^o 821.	B. Bs. : juillet 1930.	+	—
12 ^o Vaccine Lederle C ^o .	B. L. S. : juillet 1930.	+	—
13 ^o Vaccine Squibbs . . .	B. H. I. C. : juillet 1930.	+	—
14 ^o Vaccine Vienne K13 .	B. V.13 : juillet 1930.	+	—
15 ^o Vaccine Vienne K14 .	B. V.14 : juillet 1930.	+	—
16 ^o Vaccine Vienne K15 .	B. V.14 : juillet 1930.	+	—
17 ^o Vaccine Cologne . . .	B. Col. : juillet 1930.	+	—
<i>Légende.</i> — +, lyse; —, pas de lyse.			

et même bactériophage monovalent. En réalité, cela ne paraît pas exact; il existe entre tous les représentants d'un même groupe certaines différences individuelles et c'est notamment l'aptitude plus ou moins marquée que les sérums d'un même groupe ont à neutraliser partiellement les bactériophages de l'autre groupe qui permet de les distinguer entre eux. C'est ainsi que les sérums anti-B. L. et anti B. H. du premier groupe, qui neutralisent également bien et complètement tous les bac-

tériophages du premier groupe (B. H., B. L. et B. K.), ont sur les divers bactériophages du second groupe une action neutralisante partielle d'intensité différente. Le sérum anti-B. L., par exemple, exerce sur le B. V. 15 du second groupe une neutralisation partielle que n'exerce pas le sérum anti-B. H.; par contre, ce sérum anti-B. H., qui est pratiquement inactif sur

TABLEAU II.

BACTÉRIOPHAGES	PURS	BACTÉRIOPHAGES ADDITIONNÉS DE				LECTURE après
		Sérum normal	Sérum anti-B. H.	Sérum anti-B. L.	Sérum anti-B. L. S.	
B. H.	----- -----	----- -----	++++ ++++	++++ ++++	++++ -----	24 heures. 4 jours.
B. L.	----- -----	----- -----	++++ ++++	++++ ++++	++++ -----	24 heures. 4 jours.
B. L. S.	----- -----	----- -----	++++ -----	----- -----	++++ ++++	24 heures. 4 jours.
B. D.	----- -----	----- -----	+++ -----	----- -----	++++ ++++	24 heures. 4 jours.
B. Col.	----- -----	----- -----	++++ ++	++++ -----	++++ ++++	24 heures. 4 jours.
B. V. 15	----- -----	----- -----	----- -----	++++ ++	++++ ++++	24 heures. 4 jours.

Légende. — + + + +, trouble égal à celui de la culture témoin, pas de lyse; — — — —, lyse totale; ++ — —, lyse partielle. Comme réactif pour la lyse on a utilisé le Staphylocoque blanc V, sensible aux deux groupes de bactériophages.

le B. V. 15, a une action beaucoup plus marquée que le sérum anti-B. L., sur un autre bactériophage du second groupe, le B. Col. C'est ce que montrent les résultats réunis dans le tableau II.

J'ai montré jadis avec Jaumain [41] que le sérum normal de différents animaux exerce une action inhibitrice intense, mais passagère sur la lyse par le B. H. polyvalent. J'ai constaté dans la suite que cette inhibition est nulle sur la lyse par le B. V.

monovalent [12]. On peut aujourd'hui étendre cette notion. Le sérum normal inhibe la lyse par tous les bactériophages du premier groupe et est sans action sur la lyse par tous les bactériophages du second groupe. En vérité, ce ne sont pas les bactériophages que le sérum normal distingue ainsi, mais bien les staphylocoques différents employés pour étudier la lyse par les deux groupes de bactériophages, dorés dans le cas des bactériophages polyvalents, blancs dans le cas des bactériophages monovalents. Il résulte, en effet, des recherches que je poursuis en ce moment avec Mutsaers que le sérum normal n'agit nullement en neutralisant les bactériophages à la façon des sérums antibactériophages spécifiques, mais bien en protégeant passagèrement les staphylocoques contre le bactériophage. Or, cette action protectrice ne s'exerce que sur les staphylocoques dorés et pas du tout sur les staphylocoques blancs qui seuls peuvent être utilisés pour étudier la lyse par les staphylocoques monovalents du second groupe. Si l'on utilise les mêmes staphylocoques blancs au lieu des staphylocoques dorés pour étudier la lyse par les bactériophages du premier groupe, l'action inhibitrice du sérum normal ne se manifeste plus et la distinction entre les deux groupes de bactériophages, à cet égard, disparaît.

Une autre distinction se révèle dans l'aptitude différente qu'ont les bactériophages du premier et du second groupe à donner la transformation vitreuse de Twort. On constate que tous ceux du second groupe donnent nettement le phénomène de Twort, avec, cependant, des différences individuelles plus ou moins marquées; le meilleur résultat étant obtenu avec le B. L. S. agissant sur la souche V. Ceux du premier groupe, au contraire, n'ont qu'une aptitude médiocre à manifester cette transformation ou plus exactement ne commencent à l'exercer que très tardivement de sorte qu'elle peut passer d'abord inaperçue.

Cette différence entre les deux groupes est, en réalité, l'expression d'une simple différence de modalité d'action des deux groupes; les bactériophages du second groupe se multiplient et s'étendent plus rapidement que ceux du premier groupe. Cette différence de modalité d'action se traduit d'ailleurs par une autre manifestation encore que voici. Lorsqu'on soumet une

culture de staphylocoque sensible à un bactériophage du second groupe convenablement dilué, il se produit des taches de dimension moyenne, c'est-à-dire de 2 millimètres environ de diamètre. Dans les conditions que j'ai précisées dans mon mémoire précédent, ces taches peuvent s'étendre ensuite progressivement en produisant l'extension de la transformation vitreuse telle



FIG. 1. — Strie de staphylocoque blanc V additionné d'un bactériophage du premier groupe, dilué à 10^{-4} . Petites taches.

que Twort l'a décrite. Au contraire, les bactériophages du premier groupe, qui, s'ils ont un champ d'action plus étendu, sont, par contre, plus lents à agir et à se multiplier, ne forment que de très petites taches comparativement aux bactériophages du second groupe et ce n'est que très tardivement d'ailleurs, aussi, que ces petites taches semblent étendre tant soit peu leur action sous forme d'une légère vitrification du matériel qui les borde immédiatement. On peut le mieux se rendre compte de ces différences en faisant sur une boîte de Pétri contenant une couche épaisse de gélose nutritive deux stries parallèles à quelques centimètres de distance, toutes les deux avec le même staphylocoque V, également sensible aux bactériophages des deux



FIG. 2. — Strie du même staphylocoque blanc V additionné d'un bactériophage du deuxième groupe, dilué à 10^{-4} . Grandes taches entourées du matériel vitreux.

groupes, mais additionné d'une dilution convenable (10^{-4}) de bactériophages B. L. S. du premier groupe pour une des stries, et de bactériophage B. H. du second groupe pour l'autre strie (voir fig. 1 et 2).

Ces différences nous amènent tout naturellement à faire un rapprochement avec ce que l'on sait pour le bactériophage du colibacille. Jetons un regard en arrière.

En 1920, Arkwright [13] montrait la dissociation des microbes du groupe coli-typhique-dysentérique en deux types, l'un dit « smooth » faisant des colonies convexes et lisses et troublant le bouillon de façon homogène, et l'autre, dit « rough », faisant des colonies plates et rugueuses, et poussant en bouillon en flocons agglutinés. Au même moment, P. H. De Kruif [14] trouvait la même dissociation — c'est lui qui créa le terme — pour le bacille de la septicémie hémorragique du lapin en deux types de microbes : l'un, très virulent, fait sur gélose des colonies convexes, lisses et opaques, et donne en bouillon un trouble diffus ; l'autre, avirulent, fait des colonies plates, rugueuses et transparentes, et donne en bouillon un trouble granuleux, agglutiné. Cette dissociation des bactéries a été généralisée depuis à d'autres espèces, et je l'ai obtenue moi-même pour le charbon [15].

Or, d'autre part, Bail [16] pour le Shiga, Asheshov [17] pour le Flexner, ont montré que l'on pouvait distinguer, au sein d'un bactériophage du groupe coli-typhique-dysentérique, deux variétés de bactériophages, l'une faisant des grandes taches, et l'autre des petites.

Déjà Bordet, d'abord avec Ciuca [18], puis seul [19], avait constaté qu'en faisant se régénérer, dans certaines conditions expérimentales, un principe anti-coli très actif, il obtenait un principe « faible » qui permettait rapidement une culture secondaire abondante, formée uniquement de colibacilles du type agglutiné et plat.

Or, j'ai constaté dans la suite [20] que ce principe dit « faible » est du bactériophage à grandes taches pur, et que les deux variétés de bactériophages à grandes taches et à petites taches correspondaient en somme aux deux types de microbes décrits par Arkwright. Le bactériophage à grandes taches attaque le type convexe et diffus, et respecte, comme on vient de le voir, le type plat et agglutiné. Le bactériophage à petites taches, au contraire, attaque le type plat et agglutiné, mais aussi certains microbes du type convexe et diffus, et respecte les autres microbes de ce type.

On peut se demander s'il n'existe pas une analogie entre ces faits et l'existence des deux groupes de bactériophages du staphylocoque. On sait, en effet, qu'il y a des staphylocoques

dorés et des staphylocoques blancs. On sait aussi qu'une culture de staphylocoque doré fraîchement isolée ne tarde pas à se dissocier en une variété dorée, instable, et une variété blanche, tandis que les staphylocoques blancs ne donnent pas de variété dorée.

Parallèlement, on voit un bactériophage faisant des petites taches qui s'attaque non seulement aux staphylocoques dorés, mais aussi aux staphylocoques blancs, et, d'autre part, un bactériophage faisant de grandes taches et ne s'attaquant, lui, qu'à certaines souches de staphylocoques blancs. On est donc amené à se demander si ce n'est pas cette dissocation non réversible des staphylocoques en variétés dorée et blanche qui entraîne corrélativement la genèse de deux groupes de bactériophages staphylococciques, l'un polyvalent, l'autre monovalent.

Au point de vue pratique, il ressort encore évidemment de ces recherches que les différences entre les deux groupes de bactériophages imposent pour l'usage thérapeutique non pas n'importe quel bactériophage isolé d'une lymphe vaccinale, mais bien uniquement ceux du premier groupe qui, étant polyvalents, peuvent seuls être utilisés avec quelque chance de succès.

(*Laboratoire de Bactériologie
de la Faculté de Médecine de Bruxelles.*)

BIBLIOGRAPHIE

- [1] TWORT, *The Lancet*, vol. II, 1915, p. 1241.
- [2] A. GRATIA, *Proceedings of the Soc. Exp. Biol. and Med.*, avril 1921; *C. R. Soc. Biol.*, 85, 1921, p. 25, etc.
- [3] BRUYNOGHE et MAISIN, *C. R. Soc. Biol.*, 85, 1921, p. 1118.
- [4] A. GRATIA, *British Med. Journ.*, vol. II, 19 août 1922, p. 296; *Ces Annales*, 46, janvier 1931, p. 1.
- [5] A. GRATIA, *C. R. Soc. Biol.*, 85, novembre 1921, p. 380; 86, janvier 1922, p. 276.
- [6] ELIAVA et POZERSKI, *C. R. Soc. Biol.*, 84, 1921, p. 708.
- [7] TWORT, *The Lancet*, novembre 1930, p. 1064.
- [8] CALLOW, *Journ. Infect. Dis.*, 30, 1922, p. 643.
- [9] BORDET et RENAUX, *Ces Annales*, 42, 1928, p. 1324.
- [10] A. GRATIA et DE NAMUR, *C. R. Soc. Biol.*, 87, 1922, p. 99; 87, 1922, p. 364.
- [11] A. GRATIA et JAUMAIN, *C. R. Soc. Biol.*, 85, 1921, p. 882.
- [12] A. GRATIA et DE NAMUR, *C. R. Soc. Biol.*, 87, 1922, p. 365.

- [13] J. A. ARKWRIGHT, *Journ. Path. Bact.*, **23**, 1920, p. 358 ; **24**, 1921, p. 36.
- [14] P. H. DE KRAUF, *Journ. Exp. Med.*, **33**, 1921, p. 773.
- [15] A. GRATIA, *C. R. Soc. Biol.*, **90**, 1924, p. 369.
- [16] BAIL, *Wiener Klin. Woch.*, nos 20 et 27, 1921 ; nos 6 et 8, 1922.
- [17] ASHESHOV, *C. R. Soc. Biol.*, **87**, 1922, p. 1342.
- [18] BORDET et CIUCA, *C. R. Soc. Biol.*, **87**, 1922, p. 366.
- [19] BORDET, *C. R. Soc. Biol.*, **87**, 1922, p. 987.
- [20] A. GRATIA, *C. R. Soc. Biol.*, **89**, 1923, p. 821.

NOTE ADDITIONNELLE
SUR L'AGENT INFECTIEUX DE LA SCHLAMMFIEBER
OU LEPTOSPIROSIS GRIPPO-TYPHOSA AQUATILIS

par SERGE TARASSOFF.

Dans mon article sur ce sujet (voir *Ces Annales*, n° 2, février 1931), j'ai exposé l'historique de la découverte de l'agent infectieux de la Schlammfieber, sans traiter la question de priorité de cette découverte hors de l'U. R. S. S.

M. J. E. Dinger et M^{me} Françoise Wierma-Werschaffelt, en relatant que la découverte en avait été faite en 1926, par le professeur Prausnitz et le D^r Lubinsky, m'obligent à revenir sur l'origine de cette découverte sans qu'il entre, en aucune manière, dans mon esprit, l'intention de diminuer la valeur des travaux des savants dont il s'agit.

Pour être clair, je dois comparer les résultats de mon travail avec ceux des autres chercheurs.

En 1928, j'ai obtenu, du sang de deux malades atteints de Schlammfieber, deux cultures de Leptospire du type Spirochète Inada et Ido. J'ai réussi à les réensemencer jusqu'à ce jour, ce qui m'a permis de différencier ce Leptospire des autres Spirochètes du même genre, et la maladie elle-même de l'ictère infectieux.

En 1929 et en 1930, j'ai isolé de plusieurs malades atteints de Schlammfieber, en dehors de toute épidémie, de nouvelles souches du même Leptospire, ce qui a démontré que la Leptospirose anictérique, *sui generis*, soit *Leptospirosis grippo-typHosa aquatilis*, existe en Europe, non seulement à l'état d'épidémie, mais également comme maladie endémique.

En même temps, par une série de recherches, j'ai démontré,

pour la première fois en Europe, que le *Leptospire aquicole* est largement répandu dans les foyers de Schlammfieber.

Dans le travail du professeur Prausnitz et du D^r Lubinsky, publié en 1926 (*Klin. Woch.*, n° 44, 1926), nous lisons qu'ils ont réussi à obtenir, d'un]malade atteint de Schlammfieber, deux cultures où se trouvaient beaucoup de Spirochètes du type Weill, très mobiles, mais que, malgré tous leurs efforts, ils n'ont pu réensemencer, et cela sur tous les milieux possibles. Avec cette culture, les auteurs ont fait des inoculations aux divers animaux d'expériences, mais sans aucun résultat, et sans pouvoir constater de fièvre, ce qui a permis au D^r Bachenine de comparer ces Spirochètes aux siens, dont les uns étaient visiblement attachés aux globules rouges. Ce n'étaient, en réalité, que des pseudo-spirochètes (*Hygiène et Epidémiologie*, n° 3, 1928, en russe).

Pourtant les micro-photographies du professeur Prausnitz et du D^r Lubinsky sont tout autres que celles du D^r Bachenine; de même mon Spirochète est tout autre que celui du professeur Prausnitz et du D^r Lubinsky.

Le mien s'obtient facilement en culture du sang des malades et subsiste dans cette première culture plus de huit mois sans repiquage; réensemencé, il se conserve en culture, même plus d'un an, et, en général, il se repique sans difficulté. Il est différent à divers points de vue de tous les Spirochètes du même genre connus jusqu'à présent. Inoculé à des cobayes, il provoque de la fièvre et une perte de poids, ces deux symptômes donnant deux courbes caractéristiques; en outre, il a produit la Schlammfieber dans un cas d'infection de laboratoire.

Les recherches du professeur Prausnitz et du D^r Lubinsky sur le Spirochète aquicole sont restées sans résultats.

En 1926, M. le D^r Brill (*Munch. Med. Woch.*, n° 36, 1927) a trouvé, dans les frottis du sang de malades atteints de Schlammfieber, des formations rappelant un Spirochète, mais la description faite par le professeur Schilling, ainsi que la micro-photographie de ce germe, n'ont rien de commun avec *Leptospira grippo-typhosa*, agent infectieux de la Schlammfieber.

Après que j'eus publié ma première communication sur l'étiologie des fièvres dites d'origine hydrique, dans le n° 9, septembre

1928, du journal russe *Hygiène et Épidémiologie* (1) a paru dans *Centralblatt für Bakteriologie*, Bd 109, 1-4, 28 octobre 1928, le travail de M. le professeur Kathe, où il reconnaît la Schlammfieber comme une maladie de Weill de courte durée, et dit avoir trouvé dans la culture du sang d'un malade mort de cette affection, ainsi que dans les coupes du rein, des Spirochètes du type Weill.

Ce Spirochète de Kathe, également, n'a pas pu être réensemencé, et son étude n'a pas été poursuivie. La clinique et l'autopsie du malade ont donné le tableau de l'ictère infectieux.

Ici nous devons rappeler que le Dr Jacobsthal (*Centrbl. f. inner. Med.*, n° 42, 1927) a observé, en 1926, également pendant une épidémie de Schlammfieber, des cas isolés d'ictère infectieux dont il a obtenu des cultures de Spirochète *ictero-hemorragiæ*, ce qui prouve qu'on peut s'attendre à rencontrer simultanément différentes Spirochètoses, de même que nous trouvons le typhus abdominal à côté des paratyphus, et *vice versa*.

Nous voyons ainsi que pour tous les observateurs que nous avons cités la question de l'étiologie de la Schlammfieber est restée en suspens, sans base certaine, ainsi que le disent parfaitement le professeur Prausnitz et le Dr Lubinsky : « Wenn auch unsere Ergebnisse keinen *sicheren* (2) Anhalt für die Ätiologie dieser interessanten Krankheit geliefert haben, so ist es doch in hohem Masse wahrscheinlich, dass hier eine echte Spirochäteninfektion vorliegt ». (*Klin. Woch.*, n° 44, 1926.)

En terminant cet historique, je pense être en droit de réclamer la priorité de la découverte de l'agent infectieux de la Schlammfieber.

A la deuxième remarque de M. Dinger et M^{me} Wierma-Werschaffelt, je dois répondre que ce n'est pas la ressemblance morphologique entre *Leptospire aquicola* et *Leptospire grippotyphosa* qui me fait penser au rôle du premier de ces Spirochètes dans l'épidémiologie de la Schlammfieber, mais l'observation

(1) M. le Dr EPSTEIN, en rentrant de voyage après une absence de quatre mois, a publié dans *Archiv für Schiffs und Tropenhygiene*, 33, 1929, 222-223, l'article : « Zur Ätiologie des sogenannten Schlamm oder Wasser fiebers » von Priv Doz-Dr H. Epstein und Dr S. Tarassoff, où il a omis de rappeler la date de cette première communication, quoiqu'il l'ait signée avec moi, en sa qualité de chef de service.

(2) Ce sont les auteurs eux-mêmes qui soulignent.

épidémiologique, qui date en Allemagne de près d'un demi-siècle, ce qui, toutefois, ne dispense pas le laboratoire de présenter les preuves.

Les auteurs s'étonnent de n'avoir pu reproduire l'ictère infectieux avec leurs souches aquicoles. A mon avis, il est bien superflu de chercher toujours à reproduire l'ictère infectieux chez le cobaye, alors que nous connaissons déjà différentes *Leptospiroses*.

TRAITEMENT DES INFECTIONS BACTÉRIENNES. THÉRAPEUTIQUE VACCINALE ET IMMUNISATION *IN VITRO*

par Sir ALMROTH E. WRIGHT, M. D., F. R. S.

Le traitement des infections de l'organisme peut être envisagé de quatre manières différentes :

a) On peut essayer d'éliminer les microbes par des moyens mécaniques ;

b) On peut se proposer de les tuer par des substances chimiques antiseptiques ;

c) On peut faire intervenir les pouvoirs antimicrobiens propres dont dispose l'organisme, sans essayer de les renforcer ;

d) On peut s'efforcer d'augmenter activement ou passivement le pouvoir bactéricide du sang.

Avant d'exposer mon opinion sur la thérapeutique vaccinale, je crois utile de passer brièvement en revue ces diverses méthodes de traitement.

EXTIRPATION CHIRURGICALE. — Parmi les méthodes d'extirpation chirurgicale, nous distinguerons celles qui se bornent à l'éradication du seul foyer d'infection, et que nous appellerons *opérations incomplètes*, et celles qui ont pour but non seulement d'éloigner le foyer d'infection, mais en même temps tous les lieux de moindre résistance. Le premier genre d'opérations était fréquemment employé, il y a quelques années seulement, dans le traitement de la tuberculose chirurgicale. On pensait que, la source principale de l'infection une fois tarie, l'organisme saurait triompher des germes qu'il hébergeait encore. Naturellement, le résultat obtenu était très souvent décevant, car on assistait fréquemment à une recrudescence de l'infection après l'intervention.

Il ne pouvait guère en être autrement ; car on doit toujours

craindre qu'une opération sur un foyer infecté ne produise une phase négative, pendant laquelle le pouvoir antimicrobien de l'organisme sera diminué. D'autre part, une énucléation, laissant après elle une plaie infectée, comporte certains risques.

TRAITEMENT ANTISEPTIQUE. — L'histoire du traitement antiseptique nous montre les conséquences de cette hypothèse erronée, d'après laquelle un agent chimique, lorsqu'il tue des microbes en suspension aqueuse, agirait de la même façon quand il est introduit dans des tissus imprégnés de sérum, dans du pus et dans du sang. Le médecin moyen, convaincu que l'observation clinique ne tarderait pas à démontrer l'inexactitude de cette présomption, si elle ne correspondait pas aux faits, persiste à l'accepter. Mais sa créance est bien mal placée. Un traitement est manifestement nuisible quand l'état du malade qui le subit s'aggrave sérieusement à sa suite, ce qui arrive souvent. L'efficacité d'un traitement est prouvée quand il est suivi d'une amélioration nette du malade. Mais en dehors de ces cas extrêmes, il en existe un grand nombre où l'observation clinique ne nous permet pas de décider si un traitement se montre efficace, dangereux ou indifférent.

Lorsqu'on veut se former un jugement sur ce point, il est indispensable de se rendre compte avant tout de l'insuffisance de nos moyens naturels d'observation, et qu'on ne peut se fonder sur des signes indirects comme l'état général de l'organisme ou l'absence de réaction inflammatoire visible dans une plaie. Si nous voulons vraiment obtenir une thérapeutique sérieuse des infections microbiennes, nous devons satisfaire à deux conditions. *Premièrement*, nous devons expérimenter sur des produits biologiques simples, comme le sang, le pus ou les liquides inflammatoires, extraits d'un foyer d'infection, ou, mieux encore, sur du sérum, du liquide de transsudation et des leucocytes.

En second lieu, nous devons avoir recours aux techniques de laboratoire et aux appareils scientifiques, pour découvrir les effets possibles d'une thérapeutique.

Qu'il me soit permis de donner ici un exemple du genre d'intervention thérapeutique que j'ai en vue. Lors des recherches que j'avais entreprises avec mes collaborateurs en 1911 pour

découvrir un moyen de diminuer la formidable mortalité par pneumonie dans les mines du Transvaal, nous avons, entre autres, étudié les effets d'un traitement de cette affection, qui était alors très en vogue dans quelques hôpitaux miniers et qui consiste à faire absorber certaines substances antiseptiques. Pour juger de la valeur de cette méthode, nous avons le choix entre la statistique et des recherches expérimentales portant sur l'action *in vitro* des antiseptiques en question sur des pneumocoques mis en suspension dans du sérum.

Voyons d'abord ce que la première méthode aurait exigé : nous aurions dû obtenir le contrôle du traitement dans les hôpitaux miniers; choisir un antiseptique particulier, en fixer le dosage pour tous les cas, et imposer celui-ci à tous les médecins traitants; l'expérience aurait dû porter sur un très grand nombre de cas, tandis qu'un nombre correspondant de cas témoins seraient restés sans traitement; finalement, il eût fallu dresser des protocoles de tous les cas, en vérifiant tous les diagnostics par des autopsies. En outre, nous avions affaire à un traitement qui ne nous semblait pas très efficace; il était infiniment probable que notre statistique, une fois que nous l'aurions établie, ne montrerait pas de différences assez prononcées entre les chiffres des traités et des non traités, pour permettre de tirer des conclusions précises; et c'est là un autre écueil, inhérent à ces sortes d'enquêtes.

Qu'on se représente, à part ces désavantages, ce que l'établissement d'une statistique de ce genre exige de temps et le nombre formidable de cas qui doivent y figurer, pour qu'on puisse se prononcer sur une seule question, par exemple celle du dosage ou celle du meilleur antiseptique. Il est donc évident que la méthode statistique seule ne pouvait nous permettre de nous prononcer sur la valeur du procédé thérapeutique peu actif. Restait le recours au laboratoire.

Parmi les premières tentatives expérimentales effectuées en vue de déterminer la valeur thérapeutique d'un antiseptique, on doit citer celle de Koch. Celui-ci montra que le sublimé, incorporé à de la gélatine nutritive au taux de 1 : 1.000.000, empêche le développement dans ce milieu de la bactérie charbonneuse, mais qu'une solution de sublimé deux fois plus concentrée n'agit nullement sur le charbon du lapin. Behring a

trouvé l'explication de ce phénomène, en démontrant que le sublimé n'empêche le développement de la bactériémie dans du sérum qu'à une concentration de 1 : 10.000. On peut ainsi calculer la quantité de sublimé dont on aurait besoin pour obtenir une telle concentration de ce sel dans le sang d'un homme de 70 kilogrammes. En admettant que le volume total de son plasma fût de 2.500 cent. cubes, et que le sublimé y restât en solution, on devrait en injecter 0 gr. 25 par voie intraveineuse.

Nous nous sommes inspiré dans nos expériences de celles de Behring. Après avoir préparé des solutions graduées de l'antiseptique en question dans de l'eau et dans du sérum, nous avons ajouté des quantités identiques de culture de pneumocoque à chaque dilution. Les détails de ces expériences ont été publiés dans mon livre : « Le traitement médicamenteux et vaccinal de la pneumonie » (1). Elles nous ont montré que le lysol, la créosote et le gäïacol — les trois antiseptiques en question — tuent le pneumocoque en solution aqueuse extrêmement diluée, mais que, pour obtenir le même effet dans le sang du malade, on devrait injecter des doses toxiques (plus de 4 cent. cubes pour le lysol, et environ 0 c. c. 9 pour la créosote et le gäïacol).

Pour déterminer expérimentalement la valeur d'un antiseptique, il est, par conséquent, préférable d'employer une solution dans du sérum qu'une solution aqueuse. Toutefois, on ne doit pas oublier que cette méthode est incomplète.

Mon ami et collaborateur, le professeur A. Fleming (2), a très justement insisté sur la nécessité de rechercher expérimentalement l'action d'un antiseptique destiné à être injecté dans le courant sanguin, sur des microbes suspendus dans du sang entier, et d'en éprouver également l'action sur des microbes contenus dans du pus, s'il doit servir au traitement des plaies. Une autre méthode, préconisée par Fleming, consiste à ajouter l'antiseptique à des échantillons de sérum contenant des quantités graduées de microbes, et à aspirer ensuite les mélanges dans des tubes, dont les parois sont tapissées de leucocytes. Des échantillons témoins de sérum contenant des microbes, mais non additionnés d'antiseptique, sont aspirés dans des tubes identiques.

(1) Constable, Londres, 1914.

(2) *Proc. Roy. Soc. B.*, 1924, 96, p. 171.

Les appareils et la technique de cette méthode ayant été décrits ailleurs (1), je me bornerai à [exposer ici les résultats ainsi obtenus par des diagrammes.

La *figure 1* montre l'effet de l'addition d'un antiseptique ordinaire à du sang ensemencé avec des staphylocoques, et contenu dans une lame cellule. Une telle expérience est infiniment plus instructive que celle qui consiste à suspendre des

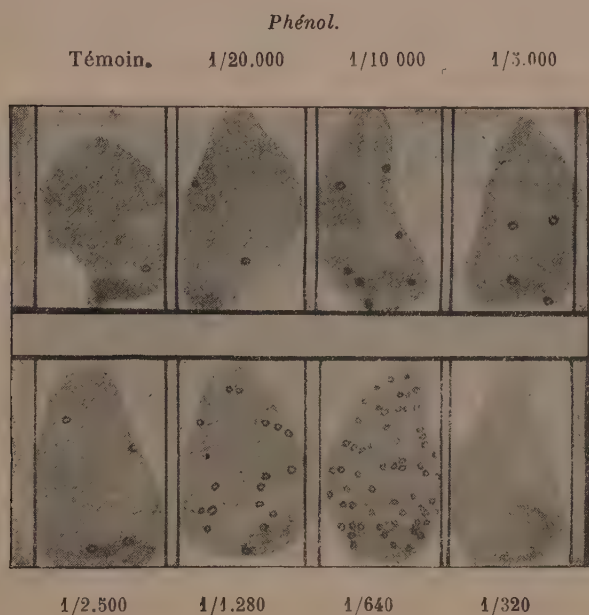


FIG. 1. — Effet de l'action du phénol sur des staphylocoques dans le sang. Volumes égaux de sang infecté et d'antiseptique dilué.

25 cent. cubes de sang infecté, ensemencés sur gélose en plaques, ont donné 56 colonies.

microbes dans du sérum. Cette dernière méthode, employée par nous en Afrique du Sud, nous avait appris que le lysol, la créosote et le gaiacol ne tuaient pas les microbes suspendus dans du sérum. Celle de Fleming montre, en outre, que l'addition de petites doses d'antiseptiques à du sang rend celui-ci plus propice au développement des microbes, et que des doses plus fortes, mais toujours médicinales, permettent une multi-

(1) *Technic of the teat and capillary tube*, 2nd édit., Constable, Londres.

plication illimitée des germes sérophiles dans le sang, grâce à la destruction des leucocytes par l'agent chimique. Les microbes ne sont tués que par des doses qui seraient franchement toxiques pour l'organisme antiseptique.

La *figure 2* (voir Planche IV) montre les mêmes résultats obtenus par Fleming dans ses expériences aussi simples qu'ingénieuses avec du pus. On voit qu'un pus frais, gardé sur une surface de gélose, sous une lamelle pour qu'il ne se dessèche pas, possède un pouvoir bactéricide plus que suffisant pour tuer les microbes qu'il contient ordinairement. L'addition de $1/2$ p. 100

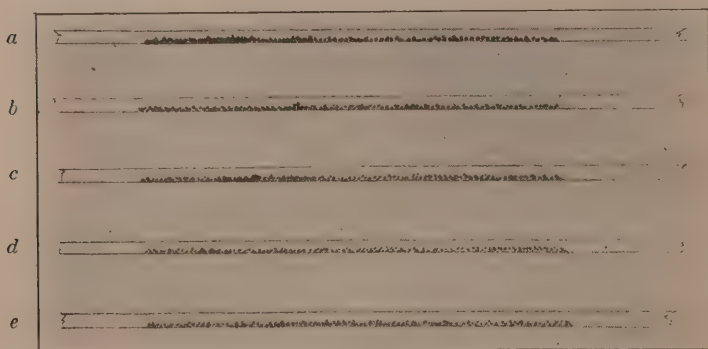


FIG. 3a. — Tubes capillaires sans leucocytes, remplis de sérum contenant la même quantité de staphylocoques; les tubes *b*, *c*, *d*, *e* étaient additionnés de phénol.

a, sérum sans phénol; *b*, sérum avec phénol au $1/3.200$; *c*, sérum avec phénol au $1/1.600$; *d*, sérum avec phénol au $1/800$; *e*, sérum avec phénol au $1/400$.

de phénol suffit pour faire disparaître le pouvoir bactéricide du pus par suite de l'empoisonnement des leucocytes.

Figure 3. — Ici des résultats analogues sont obtenus par l'aspiration dans des tubes capillaires simples et dans des tubes capillaires dont les parois sont tapissées de leucocytes, de sérum phénolé et non phénolé, additionné de staphylocoques. La figure 3 montre que quand on place ces tubes à l'étuve des colonies se forment en plus grand nombre dans tous les sérums contenant du phénol, qui empoisonne les leucocytes.

Voyons maintenant ce qu'il faut penser de ces substances antiseptiques, appelées depuis Ehrlich — expression mal choi-

sie selon moi — agents de chimiothérapie. Le choix de ce nom me semble malheureux pour deux raisons. D'abord il n'exprime pas l'intention d'Ehrlich de créer des substances qui, par leur union chimique avec les microbes, les détruisent. En second lieu, tout médicament actif et tout vaccin est susceptible d'être appelé agent chimiothérapeutique. C'est pourquoi je propose d'appeler les médicaments d'Ehrlich « antiseptiques endosériques ou endohémiques », afin de les distinguer des antiseptiques ordinaires, que je voudrais appeler « ectosériques ».

Qu'il me soit permis de résumer ici les résultats des expé-

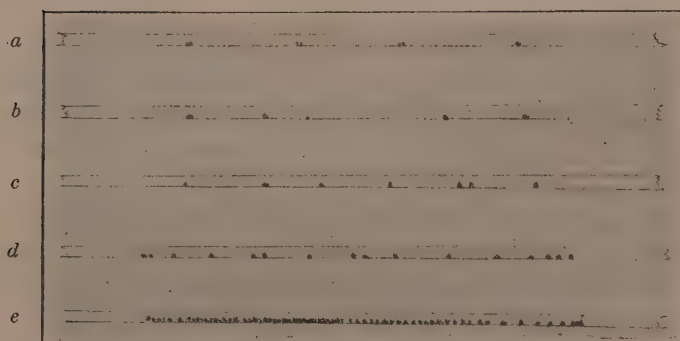


FIG. 3b. — Tubes capillaires tapissés de leucocytes, remplis de sérum contenant la même quantité de staphylocoques; *b*, *c*, *d* et *e* contiennent en outre du phénol.

a, sérum sans phénol; *b*, sérum avec phénol au 1/3.200; *c*, sérum avec phénol au 1/1.600; *d*, sérum avec phénol au 1/800; *e*, sérum avec phénol au 1/400;

riences que j'ai effectuées en Afrique du Sud en 1911. Après avoir constaté que le lysol, la créosote et le gaiacol ne tuent pas le pneumocoque dans le sang, j'ai étudié l'optochine, un dérivé de la quinine, avec lequel Morgenroth avait obtenu de très bons résultats dans le traitement de souris infectées par le pneumocoque. Ces expériences m'ont montré que l'optochine tue les pneumocoques en suspension dans de l'eau, ou dans du sérum, et cela à des dilutions jusqu'à 1 : 400.000. L'optochine se révéla en outre douée d'une action spécifique sur le pneumocoque, tandis que, comme l'on sait, des antiseptiques ectosériques ordinaires exercent leur pouvoir bactéricide sur n'importe quel microbe. Puis j'ai constaté que le

sérum des animaux et de l'homme garde un pouvoir bactéricide pour le pneumocoque pendant au moins cinq heures après l'ingestion d'optochine.

Ces résultats concordent avec ceux que Schiemann (1) a obtenus en 1905. Cet auteur montra que des pneumocoques suspendus dans du sang citraté étaient tués par l'optochine diluée à 1 : 1.000.000.

Malheureusement, l'influence délétère que l'optochine exerce sur les yeux a empêché d'essayer ce médicament à fond dans le traitement de la pneumonie humaine. Toutefois, dans le cas où il a été administré aux malades par nous ou par d'autres auteurs, les résultats ont été rien moins que brillants.

Schiemann a également démontré que le salvarsan, incorporé dans du sang à des doses médicinales, exerce une action bactéricide sur la bactériémie charbonneuse à une haute dilution, mais qu'à ce degré de dilution cette destruction demande plusieurs heures.

Voici comment j'ai eu l'idée d'étudier l'action bactéricide du salvarsan sur le streptocoque. En traitant des cas de syphilis tertiaire cutanée avec un des premiers échantillons du 606, j'ai pensé que le salvarsan pourrait agir non seulement sur les spirochètes — but d'Ehrlich — mais également sur les streptocoques et les staphylocoques associés, car j'avais été frappé par la disparition quasi magique des streptocoques dans les culturesensemencées journellement avec des sécrétions provenant de lésions de malades traités. Pour voir si le salvarsan agit directement sur le streptocoque, je l'ai injecté à un malade atteint d'une endocardite maligne. Bien entendu, ce malade est mort comme les autres, mais le salvarsan avait quand même agi favorablement en ce sens que pendant un certain temps chaque injection était suivie d'un abaissement de la température.

Plus tard, les expériences de mes collaborateurs Douglas et Colebrook (2) ont montré que le sang devient bactéricide pour le staphylocoque à la suite d'une injection de 606.

Des recherches ultérieures de Colebrook (3) sur le pouvoir

(1) *Zeits. f. Imm. Org.*, 24, 1915, p. 167.

(2) *Lancet*, 22 janvier 1916.

(3) *Med. Res. Council. Spec. Rep.*, série 119.

bactéricide du salvarsan pour le streptocoque ont eu les résultats suivants :

1° Ce sont les streptocoques hémolytiques qui sont le plus sensibles à l'action du salvarsan ; les autres variétés sont très peu influencées par le 606 à doses médicales.

2° Après une injection intraveineuse de salvarsan, le sang devient plus bactéricide pour le streptocoque hémolytique, et le même résultat est obtenu par l'addition de 606 *in vitro* à des doses médicales.

Comme l'a fait remarquer Colebrook, ceci ne signifie pas que le salvarsan n'est pas toxique pour les leucocytes, mais seulement qu'il est moins toxique pour les leucocytes que pour les streptocoques.

Colebrook constata en outre (comme l'avait fait Schiemann pour le charbon) que le salvarsan, ajouté à du sérum à dose médicinale, ne tue le streptocoque qu'après trois heures de contact seulement. Cela veut donc dire que, pour obtenir un résultat quelconque, il est indispensable que le salvarsan circule dans le sang à une concentration convenable pendant au moins le même nombre d'heures, et il sera toujours difficile de prouver expérimentalement que c'est le cas. Car il ne suffit pas de trouver une certaine quantité d'arsenic dans du sang obtenu par ponction après une injection intraveineuse : la quantité d'arsenic contenue dans un tube de sang reste la même, pendant que la teneur en arsenic du sang circulant peut aller en diminuant.

Il résulte de ces difficultés que l'utilité du salvarsan dans le traitement des infections ne peut être démontrée que par l'expérience clinique.

On a obtenu des résultats favorables avec le salvarsan dans le traitement du charbon, ce qui justifie l'espoir qu'il en sera de même pour les infections à streptocoques. Cet espoir est renforcé par l'expérience de Colebrook, qui a réussi à maintenir le pouvoir bactéricide du sang vis-à-vis du streptocoque à un degré élevé pendant plusieurs semaines par des injections sous-cutanées d'arsénicaux.

En résumé, deux conclusions ressortent de cet exposé :

1° Seuls les médicaments qui exercent à une concentration non toxique une action bactéricide dans du sérum et du sang

in vitro, sans empoisonner les leucocytes, sont susceptibles d'agir en clinique dans le sens d'une stérilisation.

2° Il est vain d'attendre des effets d'un médicament qui agit lentement et disparaît rapidement de la circulation.

En vertu de ces principes nous devons rayer de la liste des antiseptiques « endohémiques » non seulement tous les antiseptiques ordinaires, mais également un grand nombre d'agents dits chimiothérapeutiques. Nous éliminerons en premier lieu la sanocrysine, affichée comme remède chimiothérapeutique antituberculeux, quoiqu'elle ne tue pas le bacille tuberculeux dans du sérum à une dilution de 1 : 500. L'optochine, quoique tuant le pneumocoque dans du sang à dose minime, est également à proscrire à cause de sa toxicité, ainsi que le mercurochrome, qui n'a aucun pouvoir bactéricide dans le sérum ou le sang à dose médicinale maxima (1).

La flavine et le violet de gentiane ne peuvent pas non plus servir, à cause de leur action trop lente et de leur disparition rapide de la circulation (2).

Il ne nous reste donc plus comme agents chimiothérapeutiques que le salvarsan et ses dérivés, dont nous savons qu'il augmente le pouvoir bactéricide du sang pour le streptocoque et la bactérie charbonneuse, et qu'il reste peut-être assez longtemps à une concentration suffisante dans le sang circulant.

On peut donc se demander comment il convient de traiter les maladies infectieuses en dehors de la vaccinothérapie.

Je m'arrêterai un instant aux procédés que j'appelle « cataphylactiques », ayant pour but de faire intervenir dans le foyer d'infection les propriétés bactéricides du sang et des leucocytes : ouverture des abcès, évacuation des sécrétions infectées, bandages selon Bier, compresses chaudes, radio et héliothérapie, et l'application de solutions salines hypertoniques sur des surfaces infectées. Ces procédés sont toujours utiles, mais leur efficacité est proportionnée au pouvoir bactéricide du sang auquel ils font appel. Ainsi, dans le cas d'un foyer tuberculeux, l'évacuation du contenu sera suivie de succès quand le pouvoir bactéricide du sang vis-à-vis du bacille tuberculeux est

(1) R. M. FRY. *Brit. Journ. of Exp. Path.*, 7, 1926, p. 474.

(2) Expériences inédites de Colebrook et Fleming.

élevé; son utilité sera nulle quand ce pouvoir est au-dessous de la normale.

Voyons maintenant ce qu'on peut attendre de la vaccinothérapie dans le traitement des infections.

Chaque méthode de traitement doit être basée sur de saines considérations théoriques. Quels sont les principes fondamentaux de la vaccinothérapie? Ceux-là mêmes qui ont conduit Pasteur à la découverte de la vaccination antirabique. Pasteur a attiré l'attention sur le fait que, pendant la période qui s'écoule entre la morsure et l'apparition des symptômes rabiques, le malade peut être considéré comme non infecté, et qu'il est par conséquent susceptible d'être traité préventivement.

J'ai étendu ce principe, en considérant chaque infection localisée comme précurseur (généralement abortif) d'une septicémie. Je supposais que tant que l'infection reste localisée, seuls les tissus infectés participent à la défense, tandis que les tissus non infectés restent inactifs. Dans cet ordre d'idées, il était logique d'essayer de mettre en jeu, par des vaccins, les facultés immunisatrices latentes des tissus non infectés. J'entendais par ces tissus les tissus sous-cutanés et autres, avec lesquels le vaccin entrerait en contact après son absorption. A présent il me paraît préférable de remplacer le mot « tissus » par celui de « leucocytes », car j'ai obtenu la preuve concluante de l'élaboration de substances antimicrobiennes par les leucocytes, tandis que toutes mes recherches sont restées vaines pour découvrir une formation quelconque d'anticorps par les tissus fixes.

Avant d'affirmer qu'un procédé thérapeutique augmente le pouvoir bactéricide du sang, on devrait en donner des preuves expérimentales: inutile de dire que cela arrive bien rarement. Pour pouvoir répondre à cette condition, il était nécessaire de trouver de nouvelles méthodes d'examen du sang; car l'examen du sérum seul, tel que je l'avais pratiqué pour étudier les effets de la vaccination antityphique (1), ne convient pas pour les microbes sérophiles comme le staphylocoque et le streptocoque.

Ce fut pour répondre à ce besoin nouveau que feu mon ami

(1) Treatise on anti-typhoid inoculation. Constable, Londres, 1904.

et confrère Leishman élaborait sa méthode pour mesurer la phagocytose du sang. C'est grâce à cette méthode de Leishman que le titrage du pouvoir opsonique du sérum a pu être mis au point, pour être appliqué également à la vaccinothérapie.

Sans ces méthodes il eût été impossible — sauf dans les cas d'une amélioration ou d'une exacerbation frappante consécutive à une inoculation — de décider si une dose donnée de vaccin était favorable ou nuisible, s'il fallait l'augmenter ou la diminuer, et après combien de jours il fallait répéter l'inoculation.

La mesure de l'indice opsonique fournissait des indications précieuses pour le traitement des cas individuels; mais ce n'était pas le seul avantage de cette méthode. Les 30 à 50.000 titrages, effectués par nous annuellement à l'hôpital Sainte-Mary, nous ont permis de formuler les principes suivants :

1° L'introduction de n'importe quel vaccin dans l'organisme est suivie d'une phase négative et d'une phase positive (telles que je les ai décrites à propos de la vaccination antityphique) (1), quand la quantité du vaccin est suffisante pour causer un ébranlement constitutionnel. A propos de la phase négative, j'avais fait remarquer qu'elle amène une diminution passagère de la résistance antimicrobienne, et qu'il ne faut par conséquent jamais la provoquer chez un sujet vivant dans un milieu infecté, ni chez un malade déjà infecté, chez lequel la phase négative pourrait donner lieu à une exacerbation et une extension de l'infection.

2° Le second grand principe que nous ont révélé ces mesures (auxquelles le Dr John Freeman a très efficacement collaboré) fut celui de l'auto-inoculation (nous avons dû inventer ce terme), qui peut être artificiellement produite par des procédés très variés, et peut également intervenir automatiquement chez le malade. De telles auto-inoculations provoquent des phases négatives et positives exactement comme des inoculations de vaccin. Elles peuvent également être provoquées par des mouvements actifs ou passifs du malade, ou lorsqu'on augmente le cours de la lymphe dans le foyer d'infection (comme dans la méthode de Bier). L'héliothérapie, la radio-

(1) *Loc. cit.*

thérapie et la thermothérapie sont également susceptibles de produire les mêmes effets. Dès le début de nos recherches nous avons constaté que des auto-inoculations automatiques surviennent chaque fois qu'un malade, souffrant d'une infection étendue, quitte le lit. Enfin au cours d'une infection progressive, comme la phtisie ou n'importe quelle autre infection aiguë, un moment arrive où le malade, même s'il reste constamment couché, subit une série d'auto-inoculations spontanées successives. C'est le mérite du D^r Marcus Patterson d'avoir appliqué ces principes au traitement de la phtisie, et d'avoir remarqué que le succès dépend surtout ici d'une régularisation des exercices corporels et des auto-inoculations qui en dépendent. C'est le même auteur qui a compris que le repos absolu est le traitement le plus rapide des états fébriles, causés par des auto-inoculations excessives.

3° Les innombrables mesures, faites avant et après les inoculations chez les malades, avaient cet avantage pratique, qu'elles nous permettaient d'établir les doses des différents vaccins qu'on peut inoculer sans courir le risque de provoquer une phase négative.

4° Finalement nous avons pu formuler un schéma général de dosage, basé sur ce principe très important que plus le nombre de microbes infectants, agissant comme antigène dans le sang circulant, est élevé, plus la dose du vaccin doit être faible. En d'autres termes : dans le cas d'une infection généralisée, on ne donnera que les doses minima de vaccin; la dose sera intermédiaire dans les cas d'infection locale strictement limitée, et on réservera les doses fortes, produisant une phase négative, pour la vaccination préventive des personnes normales.

L'indice opsonique constitue-t-il une mesure sûre de la phagocytose du sang? Je le croyais au début, à la suite des recherches faites en collaboration avec S. R. Douglas (1) : nous prenions chez des malades ambulants sans fièvre (donc probablement sans auto-inoculation) du sang à indice opsonique élevé ou bas, et nous comparions les leucocytes qu'il contenait avec ceux de notre propre sang. Nous nous servions dans ces

(1) *Proc. Roy. Soc.*, 72, 1903 et 73, 1904.

recherches de ce que j'ai appelé depuis le procédé chiasitique : on ajoute une suspension de microbes : 1° à des globules sanguins lavés du malade, suspendus dans son propre sérum ; 2° aux mêmes globules suspendus dans du sérum normal ; 3° à des globules lavés normaux dans du sérum normal, et 4° à des globules normaux dans du sérum du malade. Ces expériences nous ont montré que le degré de phagocytose dépend presque entièrement du sérum, et non des cellules contenues dans le mélange phagocytaire.

Plus tard Shattock et Dudgeon (1) ont repris ces expériences, en employant des grains de mélanine au lieu de microbes, et en se servant de sang de malades fiévreux à auto-inoculations. Ils ont démontré que le pouvoir phagocytaire du leucocyte est un facteur variable, et qu'il peut être, chez le malade, supérieur ou inférieur à celui d'un individu normal.

Ces auteurs ont montré en outre que la phagocytose est une fonction non spécifique du leucocyte. D'après ces observations fondamentales, le pouvoir opsonique ne constitue pas une mesure exacte de la phagocytose, du moins chez des malades fiévreux.

Nous avons souvent trouvé un indice opsonique très élevé chez des tuberculeux agonisants, sans nous rendre compte que l'avidité phagocytaire des leucocytes est sujette à des changements. Il est possible qu'un examen approprié eût établi que ces indices élevés étaient contrebalancés par une diminution du pouvoir phagocytaire des leucocytes du malade. Car en poursuivant les recherches de Shattock et Dudgeon nous avons pu constater que dans les cas de septicémie grave le pouvoir phagocytaire est, en général, peu développé, alors que l'indice opsonique est élevé. La relation causale entre ces deux phénomènes est facile à entrevoir, en supposant que les leucocytes perdent leurs substances antimicrobiennes, lorsqu'elles les cèdent aux humeurs du sang.

Une autre question, plus importante encore, est celle-ci : La détermination du pouvoir phagocytaire fournit-elle toujours une mesure exacte du pouvoir antimicrobien du sang ? La réponse à cette question doit être négative, *en premier lieu*

(1) *Proc. Roy. Soc. B.*, 80, 1908, p. 465.

parce que les leucocytes n'ont pas besoin de phagocyter les microbes pour les tuer, et qu'ils agissent en excréant des substances bactéricides dans les humeurs environnantes; *en second lieu* parce que des microbes phagocytés ne sont pas forcément digérés, comme Douglas (1) l'a amplement démontré.

Par conséquent, pour mesurer exactement le pouvoir antimicrobien du sang, nous devons recourir à des méthodes qui nous permettent d'effectuer cette mesure séparément et aussi de mesurer le pouvoir antimicrobien des divers éléments qui composent le sang.

Je me suis efforcé de trouver de telles méthodes. Il s'agissait de déterminer combien d'unités, pour un nombre connu de microbes incorporés à du sang, donnent naissance à des colonies.

Nous avons entre autres employé la lame-cellule dans laquelle nous mettions du sang défibriné contenant des microbes.

Ou bien nous préparions des suspensions graduées de microbes dans du sang total non coagulé, que nous aspirions ensuite dans des tubes capillaires, qui restaient une nuit à l'étuve. Le lendemain les coagula étaient extraits par insufflation dans les tubes, et traités avec de la saponine à 1 p. 100, puis introduits dans de l'eau jusqu'à hémolyse complète; ensuite on les séchait sur lame, puis on les colorait et on comptait les colonies au microscope. Ce procédé donne des résultats plus exacts que le dénombrement à l'œil nu dans la lame-cellule (2); en outre, il permet de déterminer le rôle de la phagocytose dans la bactéricidie du sang. Car les colonies que l'on trouve se divisent en trois types : des colonies libres, non entourées de leucocytes; celles qui sont entourées par des leucocytes, et des colonies « oblitérées », c'est-à-dire des agglomérations de leucocytes remplaçant, on est en droit de le penser, des colonies détruites.

Une troisième méthode consiste à aspirer dans un long tube capillaire d'abord, une suspension diluée de microbes, puis 10 volumes égaux de sang, chacun séparé du suivant par une bulle d'air.

Ces méthodes nous ont permis de constater que le sérum

(1) *Proc. Roy. Soc. B.*, **89**, 1916.

(2) Voir ces *Annales*, **37**, 1923, p. 117.

constitue un excellent milieu de culture pour les microbes que nous considérons ici. Il en est de même pour le plasma, et les nombreuses plaquettes sanguines qu'il contient. Les globules rouges n'ont aucun pouvoir bactéricide, les microbes poussant aussi bien dans du sang sans leucocytes, obtenu par filtration (1), que dans du sérum seul. Par conséquent le pouvoir antimicrobien dépend de la présence des leucocytes. Reste à déterminer la part qui revient à la phagocytose et aux substances bactéricides sécrétées par les leucocytes dans le sérum.

On peut étudier cette dernière question en ajoutant à des volumes égaux de sang des quantités graduées de microbes. Voici les protocoles de deux expériences typiques, faites avec la lame-cellule, et concernant mon propre sang (2) [la dernière a déjà été publiée ailleurs].

Expérience, 27 juillet 1922. — Des volumes de 40 millimètres cubes de sang défibriné, auxquels sont ajoutées des quantités variées de staphylocoques, contenus dans des lames-cellules sont gardés à l'étuve pendant une nuit.

NOMBRE APPROXIMATIF de staphylocoques ajoutés au sang (1)		NOMBRE DE COLONIES développées	POURCENTAGE de microbes survivants
Par centimètre cube	Par 40 millimètres cubes		
6 400	256	95 96 } 95 1/2	39
3 200	128	57 53 } 55	43
1.600	64	34 26 } 30	47
800	32	49 41 } 45	46
400	16	44 42 } 44 1/2	72

(1) Dans toutes ces expériences, le nombre de germes ajoutés est évalué d'après le nombre de colonies développées dans du sérum.

Observateur A. EW. Autre expérience 1^{er} août 1922 : même sang, staphylocoques.

(1) WRIGHT. *Lancet*, 2 janvier 1926. FLEMING. *Brit. Journ. of exp. path.*, 7, 1926, p. 281.

(2) Le sang employé dans toutes les expériences qui suivent était le sang de l'auteur ou celui de ses collaborateurs.

NOMBRE de staphylocoques ajoutés au sang		NOMBRE DE COLONIES développées	POURCENTAGE de microbes survivants
Par centimètre cube	Par 40 millimètres cubes		
8.400	336	64	19
4.200	168	28	17
2.100	84	24	28
1.050	42	7,5	18
525	21	11,5	55
262	10 1/2	5	50
131	5	5	140
66	3	7	
33	1,5	1,5	
	671	153	22,8

Observateur L.C. : Même sang et culture.

NOMBRE de staphylocoques ajoutés au sang		NOMBRE DE COLONIES développées	POURCENTAGE de microbes survivants
Par centimètre cube	Par 40 millimètres cubes		
9.600	384	74	19
4.800	192	44	23
2.400	96	27	28
1.200	48	13	27
600	24	15	63
300	12	6	50
150	6	5	114
75	3	5	
38	1,5	2	
	766	191	24,9

On voit que les germes ajoutés au sang ne sont jamais tous tués. Cela se conçoit aisément, car pour subir l'influence intracellulaire des leucocytes il faut que les germes s'approchent de ceux-ci, et la phagocytose exige un contact entre le leucocyte et le germe. Or, il y a toujours dans le sang des espaces étendus libres de leucocytes, ou rarement traversés par ceux-ci. Des expériences appropriées montrent, en outre, que le leucocyte est insensible aux émanations chimiotactiques de microbes isolés, et par conséquent la rencontre d'un germe et d'un leucocyte, même en des points où les leucocytes sont nombreux, est toujours une question de hasard.

Plus les microbes ajoutés au sang sont nombreux, plus le nombre et le pourcentage des éléments tués sont élevés. Cela prouve que le pouvoir bactéricide du sang est stimulé par les germes.

CONCLUSION. — Nos méthodes pour mesurer la bactéricidie du sang ne sont pas comparables à des réactions quantitatives chimiques. Ce sont en effet des méthodes biologiques, établissant l'énergie bactéricide, développée par le sang sous l'influence d'une impulsion bactérienne.

Notons en passant qu'en recherchant le pouvoir opsonique dans un mélange de sérum, de leucocytes et de microbes, nous devons nous rendre compte qu'aux opsonines contenues dans le sérum avant l'expérience peuvent s'ajouter celles que sécrètent les leucocytes sous l'influence des microbes. Nous en donnerons plus loin la preuve expérimentale. Quand on centrifuge le mélange phagocytaire à la température du laboratoire, au lieu de le mettre tel quel à l'étuve, on peut réduire au minimum cette influence que les microbes exercent sur les leucocytes.

Voici comment cette idée de l'apparition d'anticorps sous l'influence de microbes dans du sang *in vitro* s'est formée dans mon esprit.

Mes premières expériences sur cette question ont été inspirées par l'échec des tentatives faites en vue de démontrer que les tissus fixes produisent des anticorps. Voici comment ces expériences furent effectuées : après introduction d'une dose de vaccin dans la veine marginale de l'oreille d'un lapin, une partie de la veine jugulaire du côté opposé fut isolée par deux ligatures, préalablement mises en place. En même temps, du sang obtenu par ponction d'une carotide était placé à l'étuve. Ces expériences nous ont appris qu'il y avait formation d'anticorps non seulement dans le sang circulant et dans le sang isolé dans la jugulaire, mais également dans le sang placé à l'étuve.

Ces expériences furent suivies d'autres (1) dans lesquelles j'ajoutais des quantités de vaccin staphylo ou streptococcique à des échantillons de mon propre sang. Après six heures

(1) C. R. Acad. des Sciences, 167, 21 octobre 1918, p. 600.

d'étuve, le sérum était décanté et aspiré dans des capillaires selon la troisième méthode décrite plus haut, avec un mélange de staphylocoques et de streptocoques vivants, et ces tubes restaient une nuit à l'étuve. Le lendemain chaque volume de sérum étaitensemencé sur un compartiment d'une plaque de gélose. Ces expériences m'ont montré : 1° que le sérum d'un sang auquel on ajoute une dose appropriée de vaccin staphylococcique ou streptococcique devient bactéricide pour les deux espèces de microbes ; 2° que le sérum d'un sang auquel une dose trop forte de vaccin a été ajoutée devient un milieu de culture plus favorable que le sérum normal pour les deux espèces de microbes.

Il ne me restait plus qu'à additionner des quantités graduées de microbes à du sang total pour compléter mes recherches. Mais pour entreprendre ces expériences je devais attendre que les méthodes appropriées fussent imaginées (culture en lamelle et autres, comme nous avons vu plus haut).

Depuis plus de douze ans je m'occupe, sans discontinuer, de recherches concernant la formation d'anticorps dans du sang *in vitro*, et mes expériences ont porté tant sur le sang total que sur ses divers éléments séparément (méthode « chiastique »). J'ai étudié les variations du pouvoir antimicrobien du sérum (nous savons que le sérum est un excellent milieu de culture pour le staphylocoque ; pourtant tous les staphylocoques vivants qu'on y ajoute ne donnent pas naissance à des colonies). J'ai essayé de préciser les variations de la phagocytose et du pouvoir opsonique, sans perdre jamais de vue le rôle joué par chacun de ces facteurs dans la bactéricidie générale du sang.

Comme antigènes j'ai employé des microbes vivants, morts ou autolysés, et j'ai recherché l'effet immunisant vis-à-vis de cultures homologues et hétérologues.

J'ai expérimenté avec du sang non encore coagulé, avec du sang coagulé ou défibriné, et des leucocytes isolés par migration spontanée ou par centrifugation.

J'ai varié mes expériences, tantôt en incorporant mes vaccins vivants ou morts au sang, tantôt en les superposant simplement au sang, ou bien en juxtaposant un mélange vaccin-sang à du sang contenant des microbes témoins (méthodes des coagula soudés).

Je ne puis donner ici qu'un bref aperçu des résultats les plus importants de ces nombreuses expériences.

Voyons d'abord les résultats des expériences « chiastiques ».

Expérience. 29 août 1922. — Etudiante inoculée par voie sous-cutanée avec 1.000 millions de staphylocoques tués. Prise du sang A avant l'inoculation, et du sang B quatre heures après. Trois suspensions différentes de staphylocoques, dont 2 mm. cubes $\frac{1}{2}$ sont ajoutés chaque fois à 50 millimètres cubes de sang.

Hémobactéricidie.

Nombre de staphylocoques ajoutés au sang . .	747	249	83
Sang A (non vacciné). Nombre de colonies développées.	13	5	1
Sang B (vacciné). Nombre de colonies développées.	4	4	2

Expérience « chiastique ».

Nombre de staphylocoques ajoutés.	420	140
---	-----	-----

Nombre de colonies développées dans :

Globules normaux (A) + sérum A	27	11
Globules du sang B + sérum B	9	2,5
Globules normaux A + sérum B	16,5	9,5
Globules du sang B + sérum A	8,5	5

Indice de bactéricidie : 3,3.

Indice d'activité du sérum : 1,45.

Indice d'activité leucocytaire : 2,8.

Expérience « chiastique », bactéricidie du sang inoculé in vitro.

100 millimètres cubes de sang humain désfibriné ainsi que 100 millimètres cubes du même sang, additionnés de 1 million de staphylocoques tués par centimètre cube, sont laissés à l'étuve pendant une heure; les sérums sont ensuite décantés avec une pipette, on en lave les globules avec de l'eau physiologique. Les globules lavés sont alors mélangés avec des volumes égaux de sérum, et à 50 millimètres cubes de chaque mélange on ajoute une quantité vingt fois plus faible de suspensions graduées de staphylocoques vivants. Les échantillons ainsiensemencés sont ensuite mis à l'étuve dans des lames-cellules.

Nombre de staphylocoquesensemencés.	736	368	184	92
-------------------------------------	-----	-----	-----	----

Colonies développées dans :

Colonies développées dans :					TOTAL
Sérum + globules normaux	25	12	5	4	46
Sérum + globules vaccinés	36	19	9	7	71
Sérum normal + globules vaccinés . .	54	20	15	6	95
Sérum vacciné + globules normaux . .	12	6	3	2	23

Indice d'efficacité bactéricide : 0,64.

Indice d'efficacité sérique : 2.

Indice d'efficacité des leucocytes : 0,5.

Comme on voit, cette expérience ne permet pas de préciser le rôle joué par les leucocytes, d'une part, et par le sérum, de l'autre, dans la bactéricidie.

D'autres expériences étaient donc indispensables. Pour bien les comprendre, on ne doit pas oublier que le nombre de microbes tués dépend de leur répartition et de celle des leucocytes, et que cette répartition est forcément modifiée au cours des manipulations par la gravitation, la rétraction du coagulum, la centrifugation et les mouvements spontanés des leucocytes. La gravitation entre surtout en jeu quand on opère avec du sang défibriné : les globules rouges et les leucocytes tombent au fond des tubes, et les microbes restent hors d'atteinte dans le sérum surnageant, où ils peuvent former des colonies si le sérum ne devient pas bactéricide.

La rétraction du coagulum rapproche les leucocytes et les microbes ; elle dépend de facteurs imprévisibles.

La centrifugation du sang non coagulé ou défibriné modifie profondément la répartition des leucocytes. Quand on centrifuge du sang non coagulé, les grands mononucléaires, les lymphocytes et une partie des plaquettes viennent à la surface, où ils forment une couche, sous laquelle s'agglomèrent la plupart des polynucléaires. La centrifugation prolongée du sang défibriné fait remonter les polynucléaires à la surface. Quand on ajoute des microbes à du sérum, à du plasma ou à du sang non bactéricide, la centrifugation ordinaire de ce mélange laisse les microbes en suspension dans le liquide surnageant. Quand on centrifuge du sang coagulé, le coagulum se trouve naturellement comprimé au fond du tube, les lacunes disparaissent, et les leucocytes et les microbes se rapprochent les uns des autres.

La centrifugation des coagula qui contiennent des microbes dans des tubes capillaires donne des résultats si frappants que je veux en donner quelques exemples.

Expérience, 7 novembre 1928. — A chacun de 4 échantillons de 50 millimètres cubes de sang, on ajoute 2 mmc. $1/2$ d'une culture de staphylocoques diluée 600 et 1.800 fois. Les mélanges, aspirés dans des tubes capillaires, sont laissés pendant six minutes à l'étuve où ils se coagulent. Deux tubes sur quatre sont ensuite centrifugés à grande vitesse pendant deux minutes, après quoi tous les tubes sont placés en position presque horizontale à l'étuve.

En même temps 4 volumes de 50 millimètres cubes de sang défibriné, con-

tenant les mêmes quantités de staphylocoques, sont mis à l'étuve dans des lames-cellules.

Des staphylocoques en suspension plus diluée sont ensuite dénombrés dans du sang dilué dans des lames-cellules.

NOMBRE de colonies développées dans du sang défibriné en lames cellules	NOMBRE de colonies développées dans les capillaires contenant du sang coagulé non centrifugé	NOMBRE de colonies développées dans les capillaires contenant du sang coagulé centrifugé
Nombre de staphylocoques ajoutés : 520		
30 } 52 } 43 43 } 46 }	48 } 40 } 44	4 } 3 } 3 1/2
Nombre de streptocoques ajoutés : 1.560		
93 } 121 } 110 114 } 111 }	124 } 129 } 126 1/2	11 } 48 } 29 1/2

Expérience, 16 novembre 1927. — Même technique.

PROPORTION d'une culture de staphylocoque ajouté	NOMBRE de colonies développées dans du sang défibriné en lame cellule	NOMBRE de colonies développées dans des capillaires contenant du sang coagulé non centrifugé	NOMBRE de colonies développées dans des capillaires contenant du sang coagulé centrifugé
$\frac{1}{594}$	48 } 38 } 43	15 } 12 } 14	0 } 2 } 1
$\frac{1}{198}$	113 } 108 } 111	39 } 65 } 52	0 } 0 } 0
$\frac{1}{132}$	∞ ∞	149 } 225 } 187	32 } 16 } 24

Reprenons maintenant les expériences dont j'ai donné à la page 654 les protocoles (expériences du 27 juillet et du 1^{er} août 1922), mais prenons des leucocytes suspendus dans du sérum au lieu de sang défibriné ou de sang frais total. Nous obtiendrions exactement les mêmes résultats.

Expérience, 31 novembre 1930. — Du sang citraté à 1/2 p. 100 est aspiré dans des tubes capillaires, à raison de 50 millimètres cubes par tube, puis

centrifugé, après quoi on décante le plasma avec une pipette. Les tubes capillaires sont alors coupés immédiatement au-dessous de la couche leucocytaire, et les leucocytes agglomérés sont mis en suspension dans 30 millimètres cubes de sérum pour chaque tube. A chaque suspension de leucocytes on ajoute 5 millimètres cubes d'une culture diluée de staphylocoques, et on aspire les mélanges dans des tubes capillaires, que l'on place à l'étuve en une position presque horizontale. Des quantités identiques de staphylocoques sont mélangées à du sérum sans leucocytes, et comptées dans des lames cellules.

DILUTION de la culture de staphylocoques ajoutée	NOMBRE de colonies développées dans du sérum seul	NOMBRE de colonies développées dans du sérum + leucocytes	POURCENTAGE des microbes survivants
$\frac{1}{100.000}$	$\begin{matrix} 8 \\ 8 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 8 \end{matrix} \right.$	$\begin{matrix} 10 \\ 8 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 9 \end{matrix} \right.$	400
$\frac{1}{50.000}$	$\begin{matrix} 16 \\ 17 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 16,5 \end{matrix} \right.$	$\begin{matrix} 2 \\ 2 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 2 \end{matrix} \right.$	12
$\frac{1}{20.000}$	(33)	$\begin{matrix} 6 \\ 4 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 5 \end{matrix} \right.$	15,5

Expérience, 7 novembre 1930. — Autre sang, même technique. sauf que dans cette expérience, à chaque suspension leucocytes + sérum (30 millimètres cubes), on ajouta 1/10 de son volume de dilutions graduées de culture de staphylocoques.

DILUTION de la culture de staphylocoques ajoutée	NOMBRE de microbes ajoutés à chaque suspension leucocytaire	NOMBRE de colonies développées dans chaque tube	POURCENTAGE des microbes survivants
$\frac{1}{200.000}$	25	$\begin{matrix} 1 \\ 1 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 1 \end{matrix} \right.$	4
$\frac{1}{100.000}$	50	$\begin{matrix} 0 \\ 1 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 0,5 \end{matrix} \right.$	1
$\frac{1}{50.000}$	100	$\begin{matrix} 1 \\ 2 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 1,5 \end{matrix} \right.$	1,5
$\frac{1}{2.500}$	2.000	$\begin{matrix} 9 \\ 7 \end{matrix} \left\{ \begin{matrix} 8 \end{matrix} \right.$	0,4

Expérience, 5 novembre 1930. — Même technique, mais ici les leucocytes agglomérés de chaque tube sont en suspension dans 15 millimètres cubes de sérum.

DILUTION de la culture de staphylocoques ajoutée	NOMBRE de microbes ajoutés à chaque suspension leucocytaire	NOMBRE de colonies développées dans chaque tube	POURCENTAGE des microbes survivants
$\frac{1}{40.000}$	36	$\left. \begin{matrix} 9 \\ 12 \end{matrix} \right\} 10,5$	28
$\frac{1}{20.000}$	72	$\left. \begin{matrix} 20 \\ 18 \end{matrix} \right\} 19$	26
$\frac{1}{10.000}$	144	$\left. \begin{matrix} 18 \\ 16 \end{matrix} \right\} 18$	12
$\frac{1}{5.000}$	288	$\left. \begin{matrix} 58 \\ 30 \end{matrix} \right\} 44$	12
$\frac{1}{2.500}$	576	$\left. \begin{matrix} 60 \\ 58 \end{matrix} \right\} 59$	10

Essayons maintenant d'évaluer séparément la bactéricidie acquise par le sérum.

La méthode la plus simple pour y parvenir est de mélanger du vaccin vivant ou mort avec du sang, de laisser le coagulum à l'étuve pendant un certain temps, de décantier ensuite le sérum, et d'ajouter à celui-ci de *très petites* quantités de microbes vivants. En voici deux exemples :

Expérience, 17 décembre 1930. — Des volumes de 50 millimètres cubes de sang sont additionnés de 5 millimètres cubes d'eau physiologique ou de culture diluée de staphylocoques, et laissés à l'étuve pendant vingt minutes, puis centrifugés. Les sérums sont ensuite décantés avec des pipettes et

	NOMBRE DE COLONIES développées dans trois volumes de sérum de chaque tube			
	1	2	3	Total
Sérums normaux (témoins)	$\left. \begin{matrix} 27 \\ 26 \end{matrix} \right\}$	$\left. \begin{matrix} 20 \\ 27 \end{matrix} \right\}$	$\left. \begin{matrix} 13 \\ 15 \end{matrix} \right\}$	$\left. \begin{matrix} 60 \\ 68 \end{matrix} \right\} 64$
Sérum de sang vacciné avec :				
320 staphylocoques par centimètre cube .	30	25	13	68
640 staphylocoques par centimètre cube .	30	24	1	55
1.280 staphylocoques par centimètre cube .	23	16	10	49
2.560 staphylocoques par centimètre cube .	18	12	0	30

aspirés dans des tubes capillaires, contenant 10 millimètres cubes d'une dilution au 1 : 1.000 de culture de staphylocoques, de telle manière que chaque tube contient trois volumes de 5 millimètres cubes de sérum, séparés par des bulles d'air.

Le tableau précédent donne le résultat de cette expérience.

D'après ce tableau, on peut calculer que, dans le cas le plus favorable, le sérum a acquis une bactéricidie suffisante pour tuer 2 500 staphylocoques par centimètre cube.

Expérience, 2 décembre 1930. — Des volumes de 50 millimètres cubes de sang sont centrifugés après coagulation. Les sérums sont séparés des culots, additionnés de tuberculine B. E., puis de nouveau versés sur les culots. Après vingt-quatre heures d'étuve, les sérums sont de nouveau décantés et traités comme dans l'expérience précédente.

	NOMBRE DE COLONIES développées dans les trois volumes de sérums de chaque tube			
	1	2	3	Total
Sérums normaux (témoins)	24 34	15 13	4 6	43 53 } 48
Sérum contenant T. B. E. dilué au :				
1	13	7	4	24
2.000.000.000	21	6	4	31 } 27 1/2
1	17	9	0	26
1.000.000.000	14	8	0	22 } 24
1	18	3	2	23
500.000.000	22	12	3	37 } 30
1	13	2	0	15
100.000.000	9	4	4	17 } 16
1	15	8	5	28
50.000.000	16	5	0	21 } 25
1	8	10	7	25
25.000.000	9	3	2	14 } 19 1/2

Ici encore, un calcul nous montre que, dans le cas le plus favorable, le sérum acquiert un pouvoir bactéricide suffisant pour tuer un peu plus de 2.000 staphylocoques par centimètre cube.

Expérience, 21 mars 1930. — A 100 millimètres cubes de sang non coagulé sont ajoutés 10 millimètres cubes d'eau physiologique ou de culture de staphylocoques; les mélanges sont laissés à l'étuve pendant vingt-cinq minutes, puis centrifugés, après quoi les sérums sont décantés. A des volumes de

40 millimètres cubes de sérum sont ajoutés 5 millimètres cubes d'une culture de staphylocoques, diluée 50.000 fois.

	NOMBRE de colonies développées.
Sérum témoin (1)	51
Sérum témoin (2)	50

Sérum de sang vacciné avec :

5 staphylocoques par centimètre cube	39
50 staphylocoques par centimètre cube	45
500 staphylocoques par centimètre cube	22
1.000 staphylocoques par centimètre cube	17
2.000 staphylocoques par centimètre cube	17
5.000 staphylocoques par centimètre cube	12
20.000 staphylocoques par centimètre cube	26

Dans le cas le plus favorable le sérum tue 950 staphylocoques par centimètre cube.

Expérience, 5 décembre 1930. — Des quantités graduées de staphylocoques sont ajoutées à une suspension diluée de leucocytes.

La suspension leucocytaire est préparée d'emblée avec du sang citraté et diluée à 1/8 du taux normal dans du sérum. A des volumes de 20 millimètres cubes de cette suspension, on ajoute 2 mmc. 1/2 de différentes dilutions de culture de staphylocoques. La numération des corps microbiens contenus dans chaque dilution a été faite avec une dilution au 1/30.000 dans du sérum normal.

DILUTION de la culture de staphylocoques au	NOMBRE de microbes ajoutés à la sus- pension leucocytaire	NOMBRE de colonies développées	POURCENTAGE des microbes survivants
$\frac{1}{1.000}$	720	$\left. \begin{array}{l} 246 \\ 272 \end{array} \right\} 259$	36
$\frac{1}{3.000}$	240	$\left. \begin{array}{l} 72 \\ 90 \\ 98 \end{array} \right\} 87$	36
$\frac{1}{10.000}$	72	$\left. \begin{array}{l} 32 \\ 33 \\ 22 \end{array} \right\} 29$	40
$\frac{1}{30.000}$	$\left. \begin{array}{l} 18 \\ 29 \\ 18 \\ 30 \\ 26 \end{array} \right\} 24$	$\left. \begin{array}{l} 8 \\ 6 \\ 11 \end{array} \right\} 8$	33
$\frac{1}{100.000}$	7	$\left. \begin{array}{l} 5 \\ 6 \\ 7 \end{array} \right\} 6$	86

Expérience, 4 décembre 1930. — Même technique.

DILUTION de la culture de staphylocoques au	NOMBRE de microbes ajoutés à la suspen- sion leucocytaire	NOMBRE de colonies développées	POURCENTAGE des microbes survivants
$\frac{1}{10.000}$	$\left. \begin{array}{l} 91 \\ 81 \\ 103 \\ 93 \\ 78 \end{array} \right\} 89$	$\left. \begin{array}{l} 6 \\ 3 \\ 12 \\ 4 \end{array} \right\} 6 \frac{1}{2}$	7
$\frac{1}{20.000}$	44	$\left. \begin{array}{l} 8 \\ 6 \\ 8 \\ 4 \end{array} \right\} 6 \frac{1}{2}$	14,8
$\frac{1}{40.000}$	$\left. \begin{array}{l} 20 \\ 14 \\ 24 \\ 32 \end{array} \right\} 22 \frac{1}{2}$	$\left. \begin{array}{l} 4 \\ 5 \\ 2 \\ 15 \end{array} \right\} 6 \frac{1}{2}$	29
$\frac{1}{80.000}$	11	$\left. \begin{array}{l} 1 \\ 6 \\ 3 \\ 5 \end{array} \right\} 3 \frac{3}{4}$	34
$\frac{1}{160.000}$	6	$\left. \begin{array}{l} 3 \\ 3 \\ 2 \\ 1 \end{array} \right\} 2 \frac{1}{4}$	37,5

Une autre méthode permettant d'étudier séparément l'activité du sérum est illustrée par les deux expériences suivantes :

Expérience, 9 décembre 1930. — Les tubes capillaires contenant chacun

DILUTION de la culture de staphylocoques au	NOMBRE de microbes ajoutés à chaque volume de sérum	NOMBRE de colonies développées	POURCENTAGE des microbes survivants
$\frac{1}{160.000}$	6	$\left. \begin{array}{l} 4 \\ 6 \end{array} \right\} 5$	84
$\frac{1}{80.000}$	12	$\left. \begin{array}{l} 2 \\ 6 \end{array} \right\} 4$	32
$\frac{1}{40.000}$	25	$\left. \begin{array}{l} 9 \\ 17 \end{array} \right\} 13$	48
$\frac{1}{20.000}$	50	$\left. \begin{array}{l} 21 \\ 19 \end{array} \right\} 20$	40
$\frac{1}{10.000}$	100	$\left. \begin{array}{l} 56 \\ 21 \end{array} \right\} 38$	38

50 millimètres cubes de sang coagulé sont centrifugés; on ajoute 2 mmc. 1/2 de culture diluée de staphylocoques à chaque volume de sérum, après décantation de celui-ci.

Les mélanges sérum-staphylocoques sont ensuite rajoutés aux culots; on centrifuge légèrement, et on laisse les tubes à l'étuve dans une position presque horizontale jusqu'au lendemain.

Ici le sérum tue 2.500 staphylocoques par centimètre cube dans le cas le plus favorable.

Expérience, 23 septembre 1930. — Même technique; mais chaque volume de sérum est d'abord inoculé avec de la tuberculine B. E., puis avec 58 staphylocoques.

	NOMBRE DE COLONIES développées	
Sérum témoin a.	52	} 52
Sérum témoin b.	52	
Sérum contenant T.B.E. au :		
$\frac{1}{2.400.000.000}$	51 74	} 49
$\frac{1}{1.200.000.000}$	42 41	
$\frac{1}{600.000.000}$	47 44	} 45 1/2
$\frac{1}{300.000.000}$	35 37	

Ici le sérum tue 640 staphylocoques par centimètre cube.

On peut encore varier l'expérience de la manière suivante :

On prend une série de tubes capillaires, divisés chacun en deux espaces de 25 millimètres cubes.

On laisse les tubes se remplir du sang prélevé à un doigt jusqu'à la division, et on expulse les coagula par insufflation après vingt à trente minutes d'étuve.

La paroi de la moitié de chaque tube est maintenant tapissée de leucocytes.

On introduit ensuite par l'autre extrémité 50 millimètres cubes de sérum dans chaque tube, mélangés avec des quantités graduées de staphylocoques.

Les deux extrémités sont alors scellées sans déplacer les colonnes de sérum et les tubes sont placés à l'étuve dans une position fortement inclinée, la partie non tapissée de leucocytes en haut.

Voici deux protocoles de ce genre d'expérience.

Expérience, 2 janvier 1931.

DILUTION de la culture de staphylocoques ajoutée au sérum	NOMBRE de microbes suspendus dans le sérum du segment		NOMBRE de colonies développées dans le sérum du segment		POURCENTAGE des microbes survivants dans le segment non tapissé
	Tapissé	Non tapissé	Tapissé	Non tapissé	
$\frac{1}{180.000}$	12	12	0 0	$\left. \begin{array}{l} 15 \\ 7 \end{array} \right\} 11$	90
$\frac{1}{90.000}$	24	24	0 0	$\left. \begin{array}{l} 7 \\ 5 \end{array} \right\} 6$	25
$\frac{1}{30.000}$	72	72	0 0	$\left. \begin{array}{l} 33 \\ 34 \end{array} \right\} 33 \frac{1}{2}$	48
$\frac{1}{10.000}$	216	216	0 0	$\left. \begin{array}{l} 73 \\ 82 \end{array} \right\} 77$	30
$\frac{1}{3.000}$	720	720	0 0	$\left. \begin{array}{l} 120 \\ 120 \end{array} \right\} 120$	17

Dans le cas le plus favorable le sérum dans le segment non tapissé tuait ici 24.000 staphylocoques par centimètre cube.

Même expérience, autre sang.

DILUTION de la culture de staphylocoques ajoutée au sérum	NOMBRE de microbes suspendus dans le sérum du segment		NOMBRE de colonies développées dans le sérum du segment		POURCENTAGE des microbes survivants dans le segment non tapissé
	Tapissé	Non tapissé	Tapissé	Non tapissé	
$\frac{1}{160.000}$	6	6	0 0	$\left. \begin{array}{l} 0 \\ 3 \end{array} \right\} 1,5$	
$\frac{1}{80.000}$	12	12	0 0	$\left. \begin{array}{l} 12 \\ 9 \end{array} \right\} 10,5$	87
$\frac{1}{40.000}$	24	24	0 0	$\left. \begin{array}{l} 19 \\ 19 \end{array} \right\} 19$	80
$\frac{1}{20.000}$	48	48	0 0	$\left. \begin{array}{l} 38 \\ 34 \end{array} \right\} 58$	75
$\frac{1}{10.000}$	96	96	0 0	$\left. \begin{array}{l} 50 \\ 67 \end{array} \right\} 58$	60
$\frac{1}{5.000}$	192	192	0 0	$\left. \begin{array}{l} 73 \\ 70 \end{array} \right\} 71 \frac{1}{2}$	

Ici le sérum tue dans le cas le plus favorable 4.800 staphylocoques par centimètre cube dans le segment non tapissé de leucocytes.

De ces expériences se dégage une loi générale, selon laquelle le sang total aussi bien que des suspensions de leucocytes auxquelles on ajoute des microbes acquièrent un pouvoir bactéricide, qui est presque nul quand la dose de microbes ajoutés est minime, mais qui devient de plus en plus prononcé au fur et à mesure que cette dose augmente. Les résultats sont exactement identiques quand on expérimente avec des sérums décantés de sang légèrement ou fortement vacciné, ou avec du sérum versé sur des leucocytes légèrement ou fortement vaccinés.

Nous sommes maintenant en mesure de savoir si la destruction des microbes dans du sang vacciné est due à une phagocytose plus intense ou à un renforcement du pouvoir bactéricide du sérum.

Nous verrons plus loin quelle est la part que prend l'intensification de la phagocytose au résultat total. Mais avant d'aborder le problème de la phagocytose provoquée *in vitro*, nous établirons un principe général, que nous pouvons déduire de deux des derniers protocoles reproduits plus haut. On remarquera que ces expériences diffèrent des précédentes sous deux rapports : le vaccin a été juxtaposé aux coagula au lieu d'être incorporé au sang ; contrairement à ce qui a lieu quand il est mélangé au sang, le vaccin ne produit pas d'effets opposés selon l'importance de la dose, mais de petites doses provoquent une bactéricidie positive aussi bien que de grandes doses de vaccin. Il n'y a en cela rien de surprenant, car le vaccin étant simplement versé sur le coagulum, seule une fraction du vaccin pénètre dans celui-ci, et exerce son influence sur les leucocytes ; ce sont les substances bactéricides élaborées par ces cellules, qui agissent ensuite sur les microbes en suspension dans le coagulum pendant la seconde phase de l'expérience.

Quelques considérations d'intérêt théorique se dégagent de ces expériences. Nous les développerons dans un autre article. Dès maintenant, nous pouvons dire que ces deux modes d'expérimentation peuvent être comparés à la vaccination par voie intraveineuse et par voie sous-cutanée. La première exige en effet un dosage assez minutieux, car en injectant un peu trop de vaccin, nous produisons immédiatement une phase négative, tandis qu'un vaccin injecté, même à haute dose, sous la

peau, peut néanmoins être utile au malade, l'absorption du dépôt vaccinal sous-cutané se faisant petit à petit.

La meilleure démonstration de l'intensification de la phagocytose *in vitro* par des vaccins se fait par l'emploi de sérum chauffé, presque entièrement dépourvu d'opsonines. Il suffira d'en citer un exemple :

Expérience, 5 mai 1920. — Du sang défibriné est centrifugé, et le sérum décanté et chauffé pendant quarante-cinq minutes à 60°. Les globules sont lavés plusieurs fois à l'eau physiologique. Deux volumes de sérum chauffé sont alors mélangés à un volume de globules lavés et avec 1 volume d'une culture en bouillon de staphylocoques, diluée six fois, et le tout est réparti dans des tubes. A un tube témoin on ajoute de l'eau physiologique, aux autres des dilutions différentes de tuberculine B. E. Les mélanges sont alors laissés à l'étuve pendant vingt minutes, puis centrifugés dans les deux sens quarante-cinq secondes chaque fois (1). Finalement, on fait une préparation sur lame de chaque tube.

	PHAGOCYTOSE numérotage—indice		POURCENTAGE des leucocytes ayant phagocyté	POURCENTAGE des leucocytes contenant d'incombables staphylocoques	
Sérum chauffé + glob. + $\frac{\text{staph.}}{6}$ + eau phys.	2 3,3	} 2,6	1	42 57	5 5
Sérum chauffé + glob. + $\frac{\text{staph.}}{6}$ + T. B. E. au :					
$\frac{1}{25.600.000.000}$	6	2,3	58	16	
$\frac{1}{12.600.000.000}$	2,6	1	40	8	
$\frac{1}{6.400.000.000}$	7,7	3	67	21	
$\frac{1}{3.200.000.000}$	10	3,9	66	19	
$\frac{1}{1.600.000.000}$	7,1	2,8	60	21	
$\frac{1}{800.000.000}$	6,1	2,3	49	21	
$\frac{1}{400.000.000}$	12	4,6	88	48	
$\frac{1}{200.000.000}$	5,6	2,2	56	18	

(1) FLEMING. On Wright's method of estimating the opsonic index by centrifugation. *Brit. Journ. of path.*, 8, 1927, p. 70.

S'il avait été possible de compter le nombre exact de microbes phagocytés par chaque cellule, les chiffres des deux premières colonnes de ce tableau auraient été beaucoup plus élevés, car chaque fois que ce nombre dépassait 20 (ce qui était souvent le cas, voir la dernière colonne), le chiffre 20 fut noté. Par conséquent, l'indice de phagocytose était en réalité plus élevé, et aurait atteint 7,5 ou 10 dans les cas les plus favorables.

Cette expérience montre que les leucocytes ne répondent pas seulement à l'addition de vaccin par une sécrétion de substances bactéricides dans le sérum, comme nous l'avons déjà vu plus haut, mais que la phagocytose elle-même est renforcée. Des résultats analogues mais moins frappants sont obtenus avec du sérum non chauffé. L'analyse chiasmatique de ces résultats montre que l'intensification de la phagocytose est due le plus souvent d'une part au renforcement du pouvoir opsonique du sérum et, d'autre part, à une augmentation de l'avidité phagocytaire. Il arrive pourtant quelquefois que le pouvoir opsonique est augmenté, tandis que l'avidité phagocytaire est diminuée, ou inversement.

Toutefois, les chiffres représentant l'indice phagocytaire du sang total, l'indice opsonique du sérum et l'avidité phagocytaire des leucocytes, ainsi que les chiffres obtenus d'une expérience à l'autre, s'accordent mal entre eux. Cela est dû sans doute aux différentes opérations que subissent les leucocytes, et à la présence d'éléments microbiens dans le sérum d'un sang vacciné, en dehors des opsonines, et à l'action que ces germes exercent sur les leucocytes. Les leucocytes sont des éléments vivants, que l'on ne peut comparer à des réactifs chimiques.

Considérons quelques problèmes d'ordre général, qui demandent une étude attentive.

Premièrement : quel est le facteur le plus important dans la destruction intensifiée des microbes dans du sang vacciné : la phagocytose ou la bactéricidie du sérum ? Le sang normal contient environ 7 millions $1/2$ de leucocytes par centimètre cube. Si nous ajoutons 100 microbes par centimètre cube au sang (et cela représente déjà une septicémie formidable), un simple calcul nous montre qu'une armée de 75.000 leucocytes est disponible pour la destruction de chaque microbe. Nous arrivons à des évaluations analogues, en mesurant la capacité opsonique selon la technique (phagocytaire) ordinaire : un leucocyte

normal peut phagocyter facilement 10 à 20 microbes, ce qui représente 75 à 150 millions de microbes phagocytés par centimètre cube. Par conséquent le sang normal possède déjà une capacité phagocytaire susceptible de faire face aux exigences les plus extrêmes. Il s'ensuit que si la phagocytose est insuffisante, cela tient à ce que les leucocytes atteignent difficilement les microbes. D'autre part les microbes sont beaucoup plus accessibles aux substances bactéricides dissoutes dans le sérum circulant, d'où nous pouvons conclure que la production de telles substances est infiniment plus importante pour la destruction des microbes qu'un renforcement du pouvoir phagocytaire.

Nous devons encore considérer trois autres questions : 1° l'effet immunisant immédiat; 2° la spécificité ou la non-spécificité de l'immunité (nous verrons que ce sont là des termes qui prêtent à confusion); 3° le dosage.

A propos de la vaccination antityphique, j'ai déjà dû réfuter l'opinion traditionnelle selon laquelle l'effet immunisant devient seulement manifeste dix jours après l'inoculation. En mesurant le pouvoir bactéricide du sang chez des hommes vaccinés avant et après l'inoculation du vaccin, j'ai pu démontrer (1) que l'effet immunisant se manifeste déjà pleinement vingt-quatre heures après la vaccination. En poursuivant ces recherches par des mesures de l'indice opsonique nous avons même établi que cet effet était déjà bien développé une heure après l'inoculation ou l'auto-inoculation. Et des recherches ultérieures nous ont montré qu'après une inoculation intraveineuse de vaccin l'effet immunisant apparaît dix minutes après l'injection. Des expériences sur la bactéricidie et la phagocytose du sang vacciné *in vitro* nous ont appris finalement que la réponse immunisatrice était instantanée. Nous verrons, en étudiant la question du dosage, que le temps nécessaire au développement d'un effet immunisant maximum n'est pas simplement fonction de la quantité de vaccin incorporé, mais qu'il dépend largement de la solubilité ou de l'insolubilité de l'antigène, et de la lyse de celui-ci par le sang.

Quant à la spécificité » ou à la « non-spécificité » de l'immu-

(1) Treatise on anti-typhoid inoculation. Constable, Londres, 1904.

nité, ce sont là des termes qui prêtent à confusion. S'ils signifient que la vaccination ou l'infection suscite la bactéricidie du microbe homologue ou non, on ne spécifie pas si les substances bactéricides agissent toujours sur une seule espèce déterminée de microbes ou sur plusieurs. S'ils veulent dire que pour chaque espèce microbienne une substance bactéricide spéciale est formée, on ne spécifie pas si des substances hétérologues sont élaborées à côté des substances homologues. Pour éviter toute erreur d'interprétation, il est préférable de les remplacer par la « théorie de l'effet immunisant simultanément homologue et hétérologue », la théorie des « anticorps spécifiques » et celle des « anticorps non spécifiques ». Plusieurs expériences, publiées dans cet article, nous éclairent sur la question de la spécificité ou de la non-spécificité de l'effet immunisant. Nous voyons que la tuberculine B. E. immunise contre les staphylocoques, ceux-ci contre les streptocoques, en outre du vaccin antityphique immunise contre des staphylocoques. Dans certains cas, la tuberculine B. E. immunise même mieux contre le staphylocoque que le vaccin staphylococcique lui-même.

Un tel effet hétérologue s'observe aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. La figure 4 donne une illustration frappante d'un tel effet sur le staphylocoque, obtenu par l'inoculation intraveineuse d'un colivaccin. Comme on voit, une phase négative initiale est ici suivie d'une phase positive. Sous ce rapport je voudrais faire deux remarques. La première concerne l'expression « choc protéinique », courant dans le jargon médical, et qu'on ferait mieux d'éviter. Car elle semble indiquer que le « choc » ne s'observe pas après une inoculation sous-cutanée, et qu'on l'observe seulement après des inoculations intraveineuses. Or, ceux qui se sont occupés de vaccination antityphique savent qu'une injection sous-cutanée d'une forte dose de vaccin peut être suivie de « choc », surtout chez des individus qui se livrent à des exercices physiques actifs. Le terme « choc protéinique » semble en outre assimiler les injections intraveineuses de vaccin aux injections intraveineuses de lait, de sérum étranger, etc., au lieu d'admettre que ces injections de protéine représentent un cas particulier des vaccinations. Et, ce qui est plus sérieux encore, le terme « choc protéinique » peut faire supposer que l'effet immunisant non spéci-

lique est constaté seulement après l'injection de protéines étrangères, alors qu'au contraire c'est là un effet général de toute vaccination.

Une seconde remarque concerne les numérations leucocytaires, imprimées en bas de la figure 4. Ces chiffres sont une illustration de la leucopénie, consécutive à des inoculations massives de vaccin, suivie de leucocytose. Ils sont publiés pour montrer que l'intensification de la bactéricidie, visible dans le quatrième compartiment de la lame-cellule, est indépendante de toute leucocytose.

D'autres exemples démontrent l'effet immunisant *in vivo* d'un vaccin streptococcique vis-à-vis du staphylocoque et

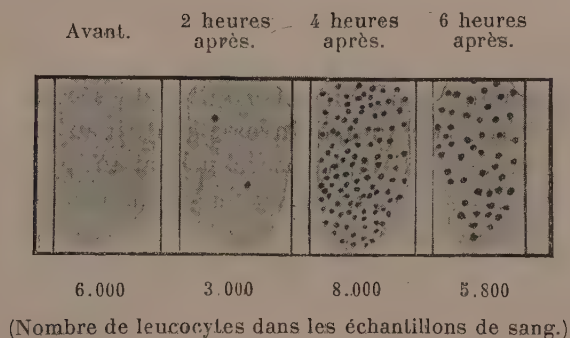


Fig. 4. — *Immunisation non spécifique.* Le malade avait reçu par voie intraveineuse un vaccin contenant 200.000.000 de *B. coli* tués. Du sang a été prélevé avant et après l'inoculation et des volumes de 50 millimètres cubes de sang défibriné, auxquels on a ajouté 225 staphylocoques, ont été cultivés dans des lames-cellules.

inversement. Ces résultats étant obtenus par des mesures phagocytaires et de séro-bactéricidie, une erreur due à des variations du nombre des leucocytes circulants n'est pas à craindre.

En dehors des expériences indiquant une immunisation non spécifique, d'autres semblent, au contraire, démontrer la spécificité de cette formation de substances immunisatrices. Je fais allusion ici aux expériences figurées par les tableaux XXXII et XLIV (1), reproduits dans mes Etudes sur l'immunisation

(1) Ces tableaux doivent toutefois être comparés aux tableaux VII et VIII, p. 387 et 388, *loc. cit.*

(p. 418 et 425), ainsi qu'à des expériences non publiées, dont une, due au D^r John Freeman, est particulièrement intéressante. Dans ces expériences, les malades étaient soumis à du massage, et le pouvoir bactéricide de leur sang était examiné vis-à-vis de deux microbes différents (cinq dans celle du D^r Freeman). Dans chaque cas le renforcement de l'immunité portait seulement sur le microbe censé être la cause de la maladie du sujet. Nous n'avons d'ailleurs aucune raison de supposer que chaque espèce microbienne immunise contre toutes les autres espèces.

Pour le praticien l'étude de la spécificité des anticorps naturels et des anticorps engendrés par l'inoculation n'offre qu'un intérêt secondaire. Il suffit d'en dire quelques mots. Bulloch (1) et Western, en étudiant les anticorps naturels du sang, ont constaté qu'on peut extraire les opsonines dirigées contre le bacille tuberculeux, sans faire disparaître du sérum les opsonines antistaphylococciques, et inversement. Il en est de même pour les opsonines antistaphylococciques et antipyocyaniques. D'autre part on a vu qu'en traitant du sérum avec des cultures mortes de vibrions cholériques et de bacilles typhiques, on en fait disparaître les bactéricidines pour ces deux espèces microbiennes (voir p. 50 et 51 de mes Etudes sur l'immunisation).

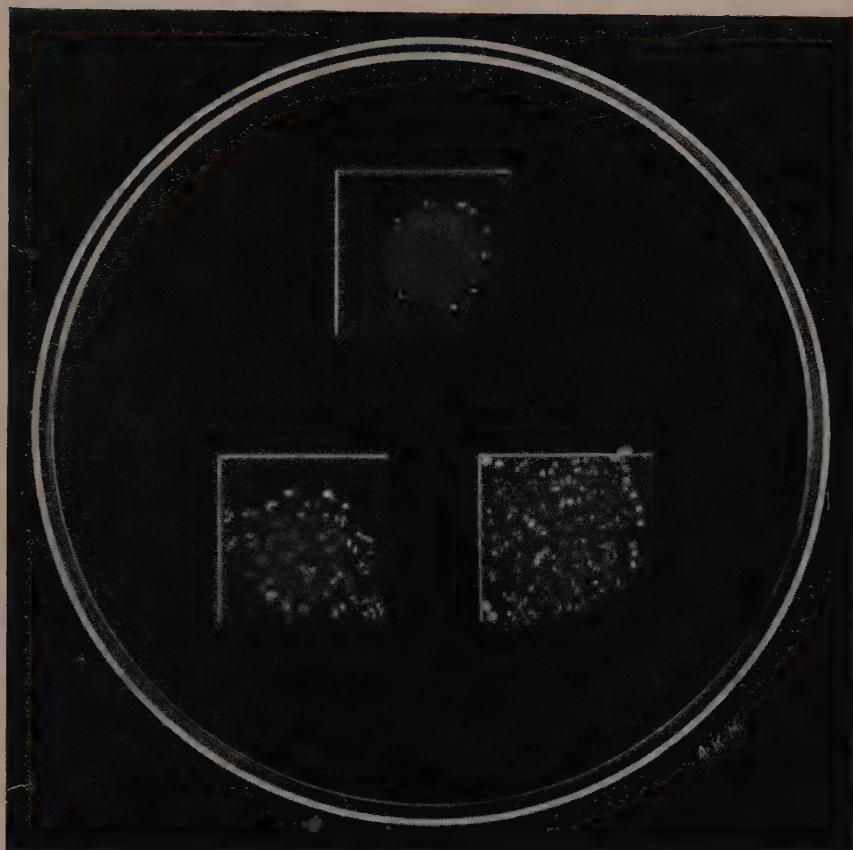
Je citerai en dernier lieu les observations de mon ancien collaborateur Hare. Les expériences de Shattock et Dudgeon (qui, comme nous l'avons vu, employaient des grains de mélanine) laissent entrevoir que « l'avidité phagocytaire » n'est pas spécifique. Or, les observations de Hare, dans des cas de septicémie puerpérale, montrent que l'avidité phagocytaire vis-à-vis du streptocoque et du staphylocoque augmente et diminue parallèlement.

Quelles sont les conclusions qu'on peut tirer de toutes ces considérations?

On a pu considérer comme paradoxal le fait que la tuberculine B. E. m'a permis d'obtenir un meilleur effet immunisant sur le staphylocoque qu'un vaccin staphylococcique. Je ne prétends pas que la meilleure immunisation ne peut être obtenue en général par un vaccin homologue; mais j'attire l'attention sur

(1) *Proc. Roy. Soc.*, Série B, 77, 1906.

a



b

c

FIG. 2. — *a*) Une goutte de pus normal, frais, provenant d'une plaie, a été déposée sur de la gélose en plaques que l'on a placée à l'étuve sous une lamelle. Tous les microbes étaient tués, excepté quelques-uns qui formaient des colonies dans la mince couche de liquide exprimée du pus par le poids de la lamelle.

b) Une goutte du même pus après chauffage à 47°.

c) Une goutte du même pus après addition de phénol au 1/300 immédiatement avant le dépôt sur gélose.

les exceptions à cette règle générale, qui peuvent se présenter, par exemple, quand le vaccin hétérologue est plus soluble dans le sang que le vaccin homologue, ou quand le sang du malade exerce une action lytique moins forte sur son propre microbe que sur un vaccin hétérologue.

La possibilité de telles exceptions étant admise, on se rendra compte que seules des expériences de laboratoire peuvent décider de la supériorité d'un vaccin A sur un vaccin B, même si le premier est hétérologue, et que de telles expériences doivent être considérées sans parti pris. Néanmoins, il convient d'examiner deux points.]

Dans les cas où le microbe infectant est inconnu, on a souvent avantage à vacciner avec des microbes qui, selon toute probabilité, sont différents de ceux qui ont infecté le malade. Je pense ici au rhumatisme articulaire et aux petites phlyctènes de la cornée, sans ignorer que l'étiologie microbienne de telles maladies est inconnue ou douteuse. Cette incertitude sur l'étiologie et des idées préconçues sur la spécificité de l'immunisation ne doivent pas, semble-t-il, nous empêcher de traiter l'une de ces maladies avec un vaccin préparé avec des streptocoques intestinaux, et l'autre avec des doses minimales de tuberculine B. E.

Le même raisonnement est exactement applicable au farcin et à d'autres infections traitées sans succès par des vaccins homologues qui, constituant des antigènes inactifs, justifient l'application d'autres antigènes plus efficaces.

Quels sont enfin, en ce qui concerne le *dosage*, les principes qui se dégagent de nos expériences *in vitro*? On se rappellera que la mesure de l'indice opsonique *in vivo* nous a conduit à ce grand principe, que plus l'infection est grave, plus la dose de vaccin doit être réduite. Il est intéressant de noter que ce principe a été confirmé par des expériences *in vitro*; à une série de quantités égales de sang, on mélange des doses graduées de microbes vivants, voilà l'analogie expérimentale des infections légères et graves *in vivo*; puis on ajoute des volumes égaux de vaccin. Le protocole suivant fournit un exemple instructif des résultats ainsi obtenus :

Expérience. — On prépare des tubes capillaires de diamètres égaux, longs d'environ 50 centimètres et marqués à une des extrémités à 10 millimètres

cubes. Dans un premier tube, on aspire d'abord 40 millimètres cubes d'une culture en bouillon de staphylocoques, diluée au 1/1000^e, puis 10 volumes de sang de 10 millimètres cubes chacun, séparés les uns des autres par des bulles d'air. On procède de la même manière pour deux autres tubes, mais ici le sang a reçu préalablement deux doses différentes de tuberculine B. E. Après vingt-quatre heures d'étuve, les coagula sont extraits par insufflation et déposés sur trois papiers filtres. Dès qu'ils adhèrent bien au papier, on les traite avec de la saponine à 1 p. 100, et on introduit les papiers filtres avec les coagula dans des récipients contenant de l'eau. Quand l'hémolyse est complète, on dépose les papiers dans des boîtes de Pétri contenant de l'eau, et on aspire les coagula dans une pipette pour les déposer ensuite sur des lames de verre, où ils sont séchés et finalement colorés.

On obtient ainsi trois séries de préparations correspondant chacune à un des trois tubes. Le tableau suivant donne le nombre de colonies développées dans chaque série de coagula.

	NOMBRE de colonies développées dans chaque compartiment de sang										NOMBRE de colonies dans		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	40 compartiments	compartiments 1-5	compartiments 6-10
Sang témoin	1	9	5	2	1	2	1	1	0	0	22	18	4
Sang inoculé avec T. B. E. :													
1													
1.000.000.000	1	3	4	1	2	0	2	0	0	0	13	11	2
1													
500.000.000	4	10	9	15	3	1	0	0	0	0	42	41	3

N.-B. — Le nombre restreint de colonies dans le premier volume de sang de chaque série est dû à la dilution de cette partie du sang par l'eau physiologique dans le tube.

On voit que le nombre total de colonies dans le sang traité avec la tuberculine B. E. au 1/100.000.000^e est presque inférieur de moitié à celui du sang témoin, et que dans le sang traité par de la tuberculine B. E. au 1/500.000.000, presque deux fois plus de colonies se sont développées que dans le sang témoin. Mais quand on considère les différentes parties du sang séparément, on voit que pour les volumes 6-10, c'est au

contraire la plus forte dose de tuberculine B. E. qui produit le meilleur effet, c'est-à-dire les parties du sang qui ont reçu les plus petites quantités de microbes vivants.

On obtient des résultats identiques, prouvant qu'il s'agit d'une loi générale dans la phagocytose expérimentale, quand on ajoute des dilutions graduées de culture de staphylocoques à du sang vacciné.

Expérience de phagocytose. — Du sang mélangé de quantités différentes de tuberculine B. E. et de culture staphylococcique est centrifugé sans incubation préalable.

	INDICES PHAGOCYTAIRES	
	Culture 5 fois diluée	Culture 15 fois diluée
Sang témoin	1	1
Sang + T. E. B. au :		
1		
1.000.000.000	0,76	1,63
1		
200.000.000	0,66	1

Expérience de phagocytose. — On mélange du sang défibriné avec de la tuberculine B. E. à doses différentes, et avec des dilutions différentes de culture de staphylocoques, puis on centrifuge immédiatement.

	INDICES PHAGOCYTAIRES			
	Culture non diluée	Culture diluée		
		3 fois	9 fois	27 fois
Sang témoin	1	1	1	1
Sang + T. B. E. au :				
1				
1.000.000.000	1,5	2,45	1,65	1,2
1				
5.000.000.000	1,4	1	1	0,96

Expérience de phagocytose. — On mélange du sang défibriné avec de la tuberculine B. E. et avec des dilutions progressives de culture de staphylo-

coques; on centrifuge immédiatement après pendant un temps d'autant plus long que la culture ajoutée était plus diluée.

	INDICES PHAGOCYTTAIRES			
	Culture non diluée	Culture diluée		
		3 fois	9 fois	27 fois
Durée de la centrifugation, en minutes	1/2	1	2	2
Sang témoin.	1	1	1	1
Sang + T.B.E. $\frac{1}{1.000.000.000}$	1,05	1,1	1,35	1,4

Il ressort de ces expériences que le meilleur effet immunisant est obtenu par l'action combinée d'une quantité moyenne de microbes vivants et de vaccin, et que plus on diminue la quantité de microbes vivants, plus il convient d'augmenter la dose du vaccin, et inversement.

Un mot encore sur la conduite à suivre quand on se trouve en présence d'un malade atteint d'une infection aiguë, et qu'il s'agit de savoir s'il est encore capable de réagir à une inoculation de vaccin, et quelle est la dose convenable. Dans un pareil cas, on peut se servir de ce que j'ai appelé l'épreuve de la réponse vaccinale. On ajoute des quantités graduées du vaccin en question à du sang du malade, et après avoir laissé les mélanges quelque temps à l'étuve, on voit si une des doses parvient à intensifier la phagocytose du sang, ou si celle-ci est diminuée par toutes les doses du vaccin.

Les résultats pratiques de cette méthode ont été publiés ailleurs (1). Il y a un grand avantage à dépister ainsi les cas d'infection grave où le sang est encore susceptible de répondre à une inoculation de vaccin.

La question du dosage soulève encore une autre considération. Dans les vaccins ordinaires, une petite fraction de l'antigène seulement se trouve en solution; le reste est à l'état d'éléments granuleux figurés, difficilement solubles dans les liquides du sang. Par conséquent, un effet immunisant causé par le vaccin

(1) Ces *Annales*, 37, 1923, p. 107.

sera dû, s'il est immédiat, à la fraction dissoute. Cet effet immédiat est figuré dans les courbes opsoniques typiques par ce que j'ai appelé une « fausse élévation » (1), suivie sans interruption par une phase positive quand la dose du vaccin était bien choisie, ou par une phase négative, suivie à son tour par une phase positive quand cette dose était excessive. Tout ceci est clairement illustré par les protocoles suivants :

Expérience de phagocytose. — Du sang [défibriné est traité avec du vaccin staphylococcique et, après des délais différents, éprouvé vis-à-vis de staphylocoques vivants par la méthode de centrifugation.

	INDICES PHAGOCYTAIRES		
	Résultat immédiat	Après 1 h. 45 à la température du laboratoire	Après 45 minutes à l'étuve
Sang témoin	1	1	1
Sang + 10.000 staphylocoques morts par centimètre cube	1,23	0,55	0,18
Sang + 5.000.000 de staphylocoques morts par centimètre cube	1,34	0,77	0,31

Expérience de phagocytose. — Même technique.

	INDICES PHAGOCYTAIRES	
	Résultat immédiat	Après 1 h. 20 d'étuve
Sang témoin	1	1
Sang + tuberculine B. E. au :		
1		
1.000.000.000	1,5	0,6
1		
200.000.000	0,57	0,7
1		
10.000.000	0,53	0,7

(1) Voir les courbes dans mes *Études sur l'immunisation*.

Expérience de phagocytose, 22 décembre 1925. — Même technique.

	INDICES PHAGOCYTTAIRES Durée de l'incubation					
	5 minutes	10 minutes	20 minutes	30 minutes	90 minutes	140 minutes
Sang témoin	1	1	1	1	1	1
Sang + T.B.E. au :						
1						
1.000.000.000	0,82	0,94	1	1,15	1,63	1,6
1						
50.000.000	0,6	0,56	1	0,8	0,76	0,86

Expérience, 23 décembre 1927.

	INDICES PHAGOCYTTAIRES Durée de l'incubation			
	5 minutes	10 minutes	1 heure	1 h 20
Sang témoin	1	1	1	1
Sang + T.B.E. au :				
1				
500.000.000	0,89	0,86	1,53	1,64
1				
5.000.000	1,25	1,25	1,25	1

Dernière expérience.

	INDICES PHAGOCYTTAIRES Durée de l'incubation				
	10 minutes	14 minutes	20 minutes	25 minutes	30 minutes
Sang témoin	1	1	1	1	1
Sang + T.B.E. au $\frac{1}{300.000.000}$	1,46	1,47	1,31	1,30	0,90

Il y a encore un dernier point sur lequel je voudrais attirer l'attention du lecteur, c'est l'analogie qu'on constate entre les

effets de l'infection *in vivo* d'une part, et ceux de l'inoculation *in vitro* de l'autre. On se rappellera peut-être que j'ai fait remarquer dès le début que dans le lupus, et en général dans les formes de tuberculose strictement localisées sans symptômes constitutionnels, l'indice opsonique est très bas (1).

Ce phénomène n'a évidemment aucun rapport avec la phase négative. Car les phases négatives ne sont jamais la conséquence d'auto-inoculations minimales, les seules qui peuvent se produire au cours d'une tuberculose strictement localisée. Elles surviennent au contraire à la suite d'inoculations ou d'auto-inoculations massives. D'autre part, une phase négative est normalement suivie par une phase positive, tandis que les indices opsoniques chez les malades en question sont au-dessous de la normale d'une façon chronique. On trouvera l'analogie de tout ceci en inoculant du sang *in vitro* avec des quantités minimales de vaccin.

Dans des expériences publiées dans cet article, on a pu voir que, quand on ajoute à du sang et à du sérum des quantités minimales de microbes vivants, un plus grand nombre de colonies se développent dans le sang. J'aurais pu ajouter un grand nombre d'expériences à cet exemple. Le même phénomène s'observe quand on ajoute des staphylocoques vivants à du sérum d'un sang préalablement traité par des doses minimales de vaccins. On verra que de tels sérums représentent souvent un meilleur milieu de culture pour le staphylocoque que le sérum normal. De même, l'addition de doses minimales de vaccin à un mélange phagocytaire diminue souvent l'indice de phagocytose.

Je termine en remerciant mes collaborateurs, et en particulier le Professeur A. Fleming, et les D^{rs} Leonard Colebrook, R. M. Fry et R. S. Mummery, d'avoir généreusement mis à ma disposition leurs travaux aussi bien que leurs idées.

(1) Voir pour cette question, ainsi que pour les recherches confirmatrices du Professeur W. BULLOCK, mes *Etudes sur l'immunisation*.

TABLE DES MATIÈRES

DU TOME XLVI

Sur l'identité du phénomène de Twort et du phénomène de d'Hérelle, par A. GRATIA	1
Le virus varicello-zonateux, par Arnold NETTER et Achille URBAIN	17
Contribution à l'étude de l'innocuité du bacille BCG pour le cobaye gravis. Recherche des éléments filtrables, par P. NÉLIS pour la partie expérimentale et E. PICARD pour la partie anatomo-pathologique	27
Séro-réactions non spécifiques de la syphilis dans la grossesse normale, par Br. STEPOWSKI	52
Sur la nature de l'algidité expérimentale décrite par G. Sanarelli, par le professeur ZDRODOWSKI, en collaboration avec le Dr K. HALAPINE (<i>partie chimique</i>) et le Dr B. WOSKRESSEŃSKI (<i>partie expérimentale</i>). .	57
Biologie du <i>Bacterium pyosep. viscosum equi</i> , par le professeur GOURVITCH (B. M.)	64
Susceptibilité de différents microbes vis-à-vis de l'hydrogène sulfuré, par MM. R. DOURIS et J. BECK. . .	73
Au sujet de l'agglutination par les sérums frais, par le Dr J. J. VAN LOGHEM	78
Étude de l'épidémie de poliomyélite du département du Bas-Rhin, par C. LEVADITI, E. SCHMUTZ et L. WILLEMEN (avec une carte)	80
Rôle du système nerveux et des réflexes conditionnels dans l'immunité, par S. METALNIKOV.	137
Trois années de vaccination préventive de la tuberculose par le BCG à Brest, par le Dr J. QUÉRANGAL DES ESSARTS et M ^{me} GUY DE CARBONNIÈRES	169

Vaccination préventive et essais de traitement de la tuberculose par le BCG, par A. RADOSSAVLIÉVITCH, M ^{me} N. STANOYÉVITCH, M ^{me} S. KOSTITCH YOKSITCH, M. RANKOVITCH, Y. NÉDELKOVITCH, VI. SPOUJITCH et M. MOURITCH	178
Purification et concentration de la toxine et de l'anatoxine diphtériques, par S. SCHMIDT, en collaboration avec A. HANSEN et K. A. KJAER	202
Sur la découverte de l'agent infectieux de la Schlammfieber ou <i>Leptospirosis grippo-typbosa aquatilis</i> , par Serge TARASSOFF	222
Quelques remarques à propos de l'article de M. le D ^r Tarassoff : « Sur la découverte de l'agent infectieux de la Schlammfieber ou <i>Leptospirosis grippo-typbosa aquatilis</i> », par les D ^{rs} J. E. DINGER et Françoise WIERSMA-VERSCHAFFELT	226
Essai de vaccination systématique des porcelets contre la peste porcine, par M. A. STAUB.	228
Étude de l'épidémie de poliomyélite du département du Bas-Rhin, par C. LEVADITI et L. WILLEMIN.	233
Bartonelloses et infections mixtes (avec 1 planche), par André LWOFF et Marcel VAUCEL	258
Sur la recherche du <i>B. coli</i> dans les eaux, par F. DIERNERT et P. ÉTRILLARD.	277
Lèpre et virus filtrable, par J. MARKIANOS	291
Transmission au <i>Cercocetus</i> de la néphrite subaiguë de l'homme, par Jean TROISIER.	296
Kystes à demodex, kystes sébacés et abcès du mouton, par M. AYNAUD.	306
Utilisation des microbes dans la lutte contre la pyrale du maïs (<i>second mémoire</i>), par S. MÉTALNIKOV, B. HERGULA et Miss STRAIL.	320
Sur l'utilisation des microbes dans la lutte contre la pyrale du maïs, par V. CHORINE.	325
Influence du rayonnement mitogénétique sur la vitesse de multiplication des bactéries, par S. B. SEWERTZOVA.	336
Sur le mécanisme de l'infection tuberculeuse expérimentale, par A. BOQUET, J. VALTIS et A. SAENZ (<i>premier mémoire</i>)	373

La tuberculose par contamination naturelle chez le lapin, par E. COULAUD (<i>deuxième mémoire</i>) [avec 2 planches]	424
Sur l'immunisation antitoxique active et sur la production intensive de l'antitoxine tétanique chez le cheval, par G. RAMON, P. DESCOMBEY et E. LEMÉTAYER.	444
Études épidémiologiques et prophylactiques du paludisme; 26 ^e , 27 ^e et 28 ^e campagnes en Algérie en 1927, 1928 et 1929, par Edm. et Et. SERGENT, L. PARROT, H. FOLEY, A. CATANEI et G. SENEVEL. . .	457
Étude de nouveaux microbes pathogènes pour la pyrale du maïs, par S. MÉTALNIKOV, J. ERMOLAEVA et SKOBELZYNE (<i>quatrième mémoire</i>).	467
Comparaison de la résistance du maïs sud-africain et du maïs américain à l'infection par la pyrale du maïs, par T. ELLINGER et V. CHORINE.	480
Sur les propriétés essentielles de l'anatoxine diphtérique, par G. RAMON	483
Contribution à la chimiothérapie du paludisme. Essais sur les calcats, par E. FOURNEAU, M. et M ^{me} J. TRÉFOUEL, Daniel BOVET et M ^{lle} G. BENOIT.	514
De la vaccination antidiphtérique par la voie cutanée, par A. BESREDKA	542
Contamination d'une lympho vaccine par le virus de la fièvre aphteuse, par le Dr T. Van HEELSBERGEN . .	558
Les bactériolysines chez les insectes, par V. ZERNOFF . .	565
Sur la teneur en zinc du foie chez le rat en voie de croissance, par M. Gabriel BERTRAND et M ^{lle} Y. BRANDT-BEAUZEMONT.	572
Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1930, par Jules VIALA	574
Nouveaux documents de la Commission Ukrainienne pour l'étude de la vaccination des nouveau-nés par le BCG. Vaccination d'un sur deux jumeaux, par B. IAKHINIS et S. CHAGALOVA	579
Action des extraits acétoniques du bacille de Koch sur les propriétés pathogènes des éléments filtrables du virus tuberculeux, par L. NÈGRE et J. VALTIS. . . .	581

Sur la technique à employer pour obtenir des filtrats contenant des éléments filtrables du virus tuberculeux, par C. NINNI	598
Effets de réinoculations successives de BCG chez le cobaye, par L. BALOZET	604
Le phénomène de Twort et la bactériophagie, par F. D'HÉRELLE	616
Le phénomène de Twort et la bactériophagie (réponse à M. d'Hérelle), par A. GRATIA	619
Recherches sur l'origine du bactériophage du staphylocoque, par A. GRATIA	622
Note additionnelle sur l'agent infectieux de la Schlammfieber ou <i>Leptospirosis grippo-typhosa aquatilis</i> , par S. TARASSOFF	635
Le traitement des infections bactériennes. Vaccinothérapie et immunisation <i>in vitro</i> , par A. E. WRIGHT. .	639

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME XLVI

AYNAUD (M.)	Kystes à demodex, kystes sébacés et abcès du mouton	306
BALOZET (L.)	Effets des réinoculations successives de BCG chez le cobaye	604
BECK (J.)	Voir Douris.	
BENOIT (M ^{lle} G.)	Voir Fourneau (E.).	
BERTRAND (G.) et BRANDT- BEAUZEMONT (Y.)	Sur la teneur en zinc du foie chez le rat en voie de croissance	572
BESREDEA (A.)	De la vaccination antidiphthérique par la voie cutanée	542
BOQUET (A.), VALTIS (J.) et SAENZ (A.)	Sur le mécanisme de l'infection tuberculeuse expérimentale (<i>premier mémoire</i>)	373
BOVET (Daniel)	Voir Fourneau (E.).	
BRANDT-BEAUZEMONT (M ^{lle} Y.)	Voir Bertrand (Gabriel).	
CARBONNIÈRES (M ^{me} Guy de)	Voir Quérangal des Essarts (Dr).	
CATANEI (A.)	Voir Sergent (Edm.).	
CHAGALOVA (S.)	Voir Iakhnis (B.).	
CHORINE (V.)	Sur l'utilisation des microbes dans la lutte contre la pyrale du maïs	325
—	Voir Ellinger (T.).	
COULAUD (E.)	La tuberculose par contamination naturelle chez le lapin (<i>deuxième mémoire</i>) [avec 2 planches]	424
DESCOMBEY (P.)	Voir Ramon (G.).	
D'HÉRELLE (F.)	Le phénomène de Twort et la bactériophagie	616
DIENERT et ETRILLARD (P.)	Sur la recherche du <i>B. coli</i> dans les eaux	277
DINGER (J. E.) et WIERSMA- VERSCHAFFELT (F.)	Quelques remarques à propos de l'article de M. le Dr Tarassoff : « Sur la découverte de l'agent infectieux de la Schlanmfieber ou <i>Leptospirosis grippo-aquatilis</i> »	226

DOURIS et BECK (J.).	Susceptibilité de différents microbes vis-à-vis de l'hydrogène sulfuré. . .	73
ELLINGER (T.) et CHORINE (V.).	Comparaison de la résistance du maïs sud-africain et du maïs africain à l'infection par la pyrale du maïs . .	480
ERMOLAEVA (J.).	Voir Metalnikov (S.).	
ETRILLARD (P.).	Voir Dienert (F.).	
FOLEY (H.).	Voir Sergent (Edm.).	
FOURNEAU (E.), TREFOUEL (M.) et M ^{me}), BOVET (Daniel) et BENOIT (M ^{ll} G.).	Contribution à la chimiothérapie du paludisme. Essais sur les calfats . . .	514
GOURVITCH (Prof.).	Biologie du <i>Bacterium pyosep. viscosum equi</i>	64
GRATIA (A.).	Sur l'identité du phénomène de Twort et du phénomène de d'Hérelle . . .	1
—	Le phénomène de Twort et la bactériophagie (réponse à M. d'Hérelle) . . .	616
—	Recherches sur l'origine du bactériophage du staphylocoque	622
HALAPINE (Dr K.).	Voir Zdrodowski (prof.).	
HANSEN (A.).	Voir Schmidt (S.).	
HERGULA (B.).	Voir Metalnikov (S.).	
IAKHNIS et CHAGALOVA (S.).	Nouveaux documents de la Commission Ukrainienne pour l'étude de la vaccination des nouveau-nés par le BCG. Vaccination d'un sur deux jumeaux	579
KJAER (K. A.).	Voir Schmidt (S.).	
KOSIITCH YOKSITCH (M ^{me} S.).	Voir Radossavlievitch (A.).	
LEMÉTAYER (E.).	Voir Ramon (G.).	
LEVADITI (G.) et WILLEMIN (L.).	Etude de l'épidémie de poliomyélite du département du Bas-Rhin. . . .	233
LEVADITI (G.), SCHMUTZ (E.) et WILLEMIN (L.).	Etude de l'épidémie de poliomyélite du département du Bas-Rhin (avec une carte)	80
LWOFF (A.) et VAUCÉL (M.).	Bartonelloses et infections mixtes (avec 1 planche)	258
MARKIANOS (J.).	Lèpre et virus filtrable.	291
METALNIKOV (S.).	Rôle du système nerveux et des réflexes conditionnels dans l'immunité . . .	137
METALNIKOV (S.), ERMOLAEVA (J.) et SKOBELZYNE.	Etude de nouveaux microbes pathogènes pour la pyrale du maïs (<i>quatrième mémoire</i>)	467

METALNIKOV (S.), HERGULA (B.) et STRAIL (Miss)	Utilisation des microbes dans la lutte contre la pyrale du maïs (second mé- moire)	320
MOURITCH (M.)	Voir Radossavlievitch (A.).	
NEDELKOVIICH (Y.)	Voir Radossavlievitch (A.).	
NÈGRE (L.) et VALTIS (J.)	Action des extraits acétoniques du ba- cille de Koch sur les propriétés pa- thogènes des éléments filtrables du virus tuberculeux	581
NELIS (P.) et PICARD (E.)	Contribution à l'étude de l'innocuité du bacille BCG pour le cobaye gra- vide. Recherches des éléments fi- ltrables	27
NETTER (Arnold) et URBAIN (A.)	Le virus varicello-zonateux.	17
NINNI (G.)	Sur la technique à employer pour ob- tenir des filtrats contenant des élé- ments filtrables du virus tubercu- leux	598
PARROT (L.)	Voir Sergent (Edm.).	
PICARD (E.)	Voir Nélis (P.).	
QUÉRANGAL DES ESSARTS et CARBONNIÈRES (M ^{me} Guy de)	Trois années de vaccination préven- tive de la tuberculose par le BCG à Brest	169
RADOSSAVLIEVITCH (A.), STA- NOYEVITCH (M ^{me} N.), KOS- TITCH YOKSITCH (M ^{me} S.), RANKOVITCH (M.), NEDELKO- VITCH (Y.), SPOUJITCH (Vl.) et MOURITCH (M.)	Vaccination preventive et essais de traitement de la tuberculose par le BCG	178
RAMON (G.)	Sur les propriétés essentielles de l'ana- toxine diphtérique.	483
RAMON (G.), DESCOMBEY (P.) et LEMÉTAYER (E.)	Sur l'immunisation antitoxique active et sur la production intensive de l'anatoxine tétanique chez le che- val	444
RANKOVITCH (M.)	Voir Radossavlievitch.	
SAENZ (A.)	Voir Boquet (A.).	
SCHMIDT (S.), HANSEN (A.) et KJÆR (K. A.)	Purification et concentration de la to- xine et de l'anatoxine diphtériques	202

SCHMUTZ (E.) et WILLEMIN (L.).	Voir Levaditi (C.).	
SENEVET (G.)	Voir Sergent (Edm.).	
SERGEANT (Edm. et Et.), PARROT (L.), FOLEY (H.), CATANEI (A.) et SENEVET (G.) . . .	Etudes épidémiologiques et prophylactiques du paludisme, 26 ^e , 27 ^e et 28 ^e campagnes en Algérie en 1927, 1928 et 1929.	457
SEWERTZOVA (S. B.)	Influence du rayonnement mitogénétique sur la vitesse de multiplication des bactéries	336
SKOBELZINE	Voir Metalnikov (S.).	
SPOUJITCH (Vl.)	Voir Radossavlievitch.	
STANOYEVITCH (M ^{me} N.) . . .	Voir Radossavlievitch.	
STAUB (A.)	Essai de vaccination systématique des porcelets contre la peste porcine.	228
STEPOWSKI (D ^r).	Séro-réactions non spécifiques de la syphilis dans la grossesse normale	52
STRAIL (Miss)	Voir Metalnikov (S.).	
TARASSOFF (Serge)	Sur la découverte de l'agent infectieux de la Schlammeieber ou <i>Leptospirosis grippo-typhosa aquatilis</i>	222
TARASSOFF (S.).	Note additionnelle de l'agent infectieux de la Schlammeieber ou <i>Leptospirosis grippo-typhosa aquatilis</i>	635
TRÉFOUEL (M. et M ^{me}).	Voir Fourneau (E.).	
TROISIER (Jean)	Transmission au Cercopithecus de la néphrite subaiguë de l'homme	296
URBAIN (Achille).	Voir Netter (Arnold).	
VALTIS (J.)	Voir Boquet (A.).	
—	Voir Nègre (L.).	
VAN HEELSBERGEN (T.)	Contamination d'une lympho vaccinale par le virus de la fièvre aphteuse.	558
VAN LOGHEM (D ^r J. J.)	Au sujet de l'agglutination par les sérums frais	78
VAUCÉL (Marcel).	Voir Lwoff (André).	
VIALA (Jules)	Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1930	574
WIERSMA - WERSCHAFFELT (D ^r Françoise)	Voir Dinger (J. E.).	
WILLEMIN (L.)	Voir Levaditi (C.).	
WOSKRESSENSKI (D ^r B.)	Voir Zdrodowski (prof.).	
WRIGHT (A. E.)	Le traitement des infections bactériennes. Vaccinothérapie et immunisation <i>in vitro</i>	639

ZDRODOWSKI (prof.), HALAPINE

(K.) et WOSKRESSENSKI (B.).

Sur la nature de l'algidité expérimentale décrite par G. Sanarelli 57

ZERNOFF (V.) Les bactériolysines chez les insectes 565

Le Gérant : G. MASSON.